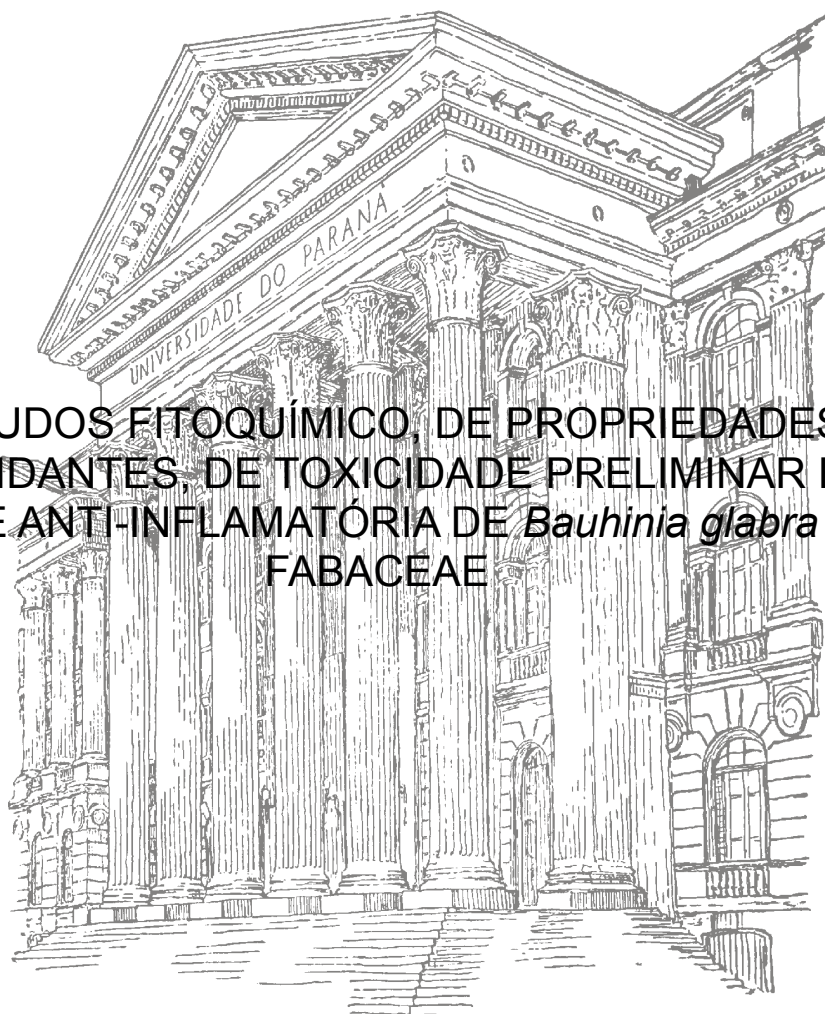


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RANIERI CAMPOS

ESTUDOS FITOQUÍMICO, DE PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES, DE TOXICIDADE PRELIMINAR E DE
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Bauhinia glabra* JACQ.,
FABACEAE



CURITIBA
2014

RANIERI CAMPOS

ESTUDOS FITOQUÍMICO, DE PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES, DE TOXICIDADE PRELIMINAR E DE
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Bauhinia glabra* JACQ.,
FABACEAE

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde
da Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para a obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra M. Warumbi Zanin

CURITIBA
2014

Campos, Ranieri

Estudos fitoquímico, de propriedades antioxidantes, de toxicidade preliminar e de atividade anti-inflamatória de *Bauhinia glabra* Jacq. (Fabaceae) / Ranieri Campos – Curitiba, 2015.
139 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Sandra Maria Warumbi Zanin

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. *Bauhinia glabra* Jacq. 2. p-Cumarato. 3. Anti-inflamatória. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Zanin, Sandra Maria Warumbi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

RANIERI CAMPOS

Título: "ESTUDOS FITOQUÍMICO, DE PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, DE TOXICIDADE PRELIMINAR E DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Bauhinia glabra* JACQ. (FABACEAE)"

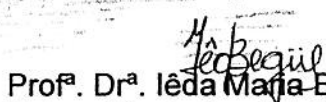
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Odílio Gomes Miguel
Orientador


Prof. Dr. Ricardo Wagner
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Eliane Carneiro Gomes
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Joise Maria da Cunha
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Iêda Maria Begnini
Universidade Regional de Blumenau

Curitiba, 18 de agosto de 2014.

*"Este é o trabalho de um farmacêutico. Esta é a química medicinal de produtos
naturais"*

[Ranieri Campos, 2014]

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre em primeiro lugar à DEUS, fonte de inspiração e força para todas as realizações desta jornada incrível que é a vida.

Agradeço também aos animais utilizados no desenvolvimento deste trabalho, que doaram sua vida. Seu sacrifício não foi em vão, e jamais será esquecido.

Agradeço à minha mãe Edeltraudt Campos e ao meu pai Blei Campos (*in memoriam*) pelo dom mais precioso que eu possuo, a vida. Agradeço pelos valores ensinados e pelos ensinamentos nunca esquecidos.

Agradeço aos meus irmãos Blei Campos Junior e Luciane Campos Gislon pelo apoio neste tempo difícil. Peço desculpas pelas ausências nos momentos importantes e fica a promessa de grandes encontros. Obrigado irmãos.

Aos meus grandes amigos, Alexandre Carvalho, Heron Cazón e Egon Sullivan, pelo companheirismo nesta jornada. Acompanharam desde o início, me viram sorrir e me viram chorar. Dedico a vocês.

A todos os colegas desta jornada de pós-graduação, Cristiane de Paula, Beatriz Hirota, Vinícius Berdnardzuck, Vanessa Cantelli, Josiane de Fátima Gaspari Dias e Milena Kalegari. Passamos por esta etapa juntos, dividimos angústias e alegrias, e nunca esqueceremos.

À doutoranda Mariana Saragioto pela correção da tese em um momento importante.

À colega e amiga desta jornada Ana Flávia Duarte pelo ombro amigo em momentos difíceis. *UNDER PRESSURE FOREVER!!!*

Ao amigo Prof. Dr. Ricardo Wagner e a Prof^a. Dr^a. Eliane Carneiro Gomes por terem sido extremamente importantes na qualificação deste trabalho. Por terem tido o cuidado e a delicadeza de corrigir cada detalhe do manuscrito.

À DIRAC, representada pelo Professor Jairo Marçal, pelo apoio a este sonho de doutoramento.

Às coordenadoras dos cursos de saúde da UNIBRASIL, minhas chefes, Maria Regina Pinheiro de Andrade Tizzot, Lilian Pereira Ferrari, Simone Biezek, Carla Regina França, Vanda Cristina Galvão Pereira e Angelita Visentin, pela paciência e compreensão nos momentos de atraso. Obrigado!

Agradeço aos colegas professores da UNIBRASIL, Cristina Peitz, Adriana Christoff, Ana Paula Weinfurter, João Carlos Domingues Repka, Fabio Godinho, Lisiane Lange da Silva, Lisângela Cristina de Oliveira, Daniel de Christo, Cláudia Seild, Rodrigo de Cássio da Silva, Vera Lúcia Pereira dos Santos e Rodrigo Cribare Prado. Perdoem-me se esqueci de alguém.

Agradeço aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, Prof^a. Dr^a. Sandra Zanin Warumby e Prof^a. Dr^a. Joice Cunha por acreditarem no meu potencial e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Anderson Barison pelo treinamento em execução de análises por RMN, e ao Departamento de Química da UFPR por disponibilizar o equipamento.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, à UFPR, à CAPES, ao programa REUNI pela estrutura, financiamento e bolsa de pesquisa disponibilizada.

Por fim agradeço a todos, que de maneira direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e a realização deste sonho.

Vocês são demais galera!!!

Química

*Sublimemos, amor. Assim as flores
No jardim não morreram se o perfume
No cristal da essência se defende.
Passemos nós as provas, os ardores;
Não caldeiam instintos sem o lume
Nem o secreto aroma que rescende.*

José Saramago, in "Os Poemas Possíveis"

RESUMO

Bauhinia glabra Jacq. é uma espécie pertencente à família Fabaceae que cresce livremente no Brasil. Este trabalho descreve o preparo do extrato bruto hidroalcoólico (EB) dos troncos de *B. glabra* e o particionamento deste extrato, bem como o isolamento de seus constituintes. Além disto apresenta a correlação multivariada entre os teores de metabólitos primários e secundários e suas propriedades antioxidantes determinados no extrato bruto e frações, o estudo toxicológico preliminar do extrato bruto e frações, além da análise da atividade anti-inflamatória do extrato bruto dos troncos desta espécie. O conteúdo total de metabólitos foi determinado pelos métodos clássicos em fitoquímica e as propriedades antioxidantes foram avaliadas pelos métodos da captura de elétrons pelo radical DPPH, poder redutor sobre o complexo do fosfomolibdênio, avaliação da inibição da lipoperoxidação pelo método do TBARS e a avaliação da recuperação do conteúdo de meta hemoglobina em suspensão de eritrócitos. A toxicidade preliminar foi avaliada pelo modelo de avaliação da letalidade causada ao microcrustáceo *Artemia salina*, e pela avaliação do potencial hemolítico. A Triagem do potencial anti-inflamatório foi realizada pelos modelos de nocicepção induzida por formalina, nocicepção térmica em placa quente, e diminuição de edema provocado por carragenina. A avaliação do possível comprometimento motor causado aos animais foi avaliado pelo método do campo aberto. O rendimento do processo de extração para o extrato bruto foi de 4,78% em relação ao material vegetal seco. Cada fração compôs o extrato bruto em: Fração hexano (21,39%); Fração clorofórmio (20,06%); Fração acetato de etila (5,68%); Fração metanol (40,23%) e; Fração remanescente (12,64%). O extrato bruto apresentou em sua composição cianidinas, saponinas, taninos condensados, flavonoides, cumarinas, fitoesteroides, clorofilas A e B, além de carotenoides. Tanto o extrato bruto como suas frações promoveram resposta sobre todos os métodos para avaliar o potencial antioxidante. As frações mais ativas foram: Fração clorofórmio e fração metanol (DPPH) com IC_{50%} de 13,76µg/mL e 13,49 µg/mL respectivamente; Fração hexano e fração clorofórmio (maior poder redutor frente ao fosfomolibdênio) com IC_{50%} de 60,99µg/mL e 64,49 µg/mL respectivamente; Fração hexano e fração clorofórmio (na inibição da peroxidação lipídica) com IPL% de 73,54% e 56,02% respectivamente e; Fração hexano (recuperação do conteúdo de meta hemoglobina) com 2,96% de recuperação. Os resultados para os teores dos grupos de metabólitos e o potencial antioxidante apresentado foram correlacionados por análise multivariada. O conteúdo total de fitoesteróis parece influenciar significativamente os resultados do ensaio sobre lipoperoxidação e sobre a recuperação do teor de meta hemoglobina. O extrato bruto e frações não apresentaram letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e foram pouco hemolíticos. Oito substâncias foram identificadas por técnicas de cromatografia. Suas estruturas foram identificadas por meio de técnicas espectroscópicas como estigmasterol (1), β-sitosterol (2), campesterol (3), *p*-cumarato de nonadecila (18), *p*-cumarato de araquidila (19), *p*-cumarato de heneicosila (20), cumarina (6) e ácido *p*-cumárico (9). Os compostos (18), (19) e (20) nunca foram isolados de uma espécie do gênero *Bauhinia* anteriormente. Além disto há relatos do composto (19) como inibidor da enzima DNA isomerase. O extrato bruto apresentou atividade sobre o modelo para a avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da formalina e o tratamento de 3mg/kg reduziu em 40,34% a resposta dos animais somente na fase 2. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos testes do campo aberto e da placa quente, entre os tratamentos e

o controle negativo. O extrato bruto apresentou atividade na diminuição do edema causado por carragenina, de maneira dose-resposta.

Palavras-chave: *Bauhinia glabra* Jacq., *p*-cumarato; anti-inflamatória; antioxidante; fitoesteroides.

ABSTRACT

Bauhinia glabra Jacq. is a species that belongs to the family of Fabaceae that grows freely in Brazil. This work describes the preparation of the crude extract of stem of *B. glabra* and the partitioning of this extract, as well as the isolation of its constituents. Furthermore, it shows the multivariate correlation between the primary and secondary metabolite contents and its antioxidant properties determined in the crude extract and fractions, the preliminary toxicology study of the crude extract and fractions, as well as the analysis of anti-inflammatory activity for the crude extract. The total content of metabolites was determined by classical methods in phytochemistry and the antioxidant properties were evaluated by methods of capture of electrons by DPPH radical, reductor power over the fosfomolibidenium complex, assessment of the inhibition of lipid peroxidation by the method of TBARS and recovery evaluation of the content of meta hemoglobin in a suspension of erythrocytes. The preliminary toxicity was evaluated according to the method of assessment of lethality caused over micro crustacean *Artemia salina*, and by evaluating the hemolytic potential. The Screening of the anti-inflammatory potential was performed by models of nociception induced by formalin, thermal nociception in a hotplate, and reduction of edema caused by carrageenan. The evaluation of the possible motor impairment caused to animals was achieved by the method of open field. The yield of the extraction process for the crude extract was 4.78% compared to dried plant material. Each fraction composed the crude extract in: hexane fraction (21.39 %); chloroform fraction (20.06 %); Fraction ethyl acetate (5.68 %); Fraction methanol (40,23 %) and; remaining Fraction (12,64 %). The crude extract showed in their composition cianidines, saponins, tannins, flavonoids, coumarins, phytosterols, chlorophyll A and B, in addition to carotenoids. Both the crude extract and its fractions promoted response on all methods to evaluate the antioxidant potential. The fractions more active were: chloroform fraction and fraction methanol (DPPH) with $CI_{50\%}$ of 13,76ug/mL and 13,49ug/mL respectively; Fraction hexane and chloroform fraction (greater reductor power) with $CI_{50\%}$ 60,99ug/mL and 64,49µg/mL, respectively; Fraction hexane and chloroform fraction (in the inhibition of lipid peroxidation) with IPL% of 73,54% and 56,02% respectively; and hexane fraction (recovery of content of target hemoglobin) with 2,96% of recovery. The results for the contents of groups of metabolites and the antioxidant potential presented were correlated by multivariate analysis. The total content of phytosterols seems to significantly influence the results of the test on lipid peroxidation and on the recovery of meta hemoglobin. The crude extract and fractions showed no lethality front to micro crustacean *Artemia salina* and were little haemolytic. Eight substances were isolated by chromatographic techniques. Their structures were identified by means of spectroscopic techniques such as stigmasterol (1), beta-sitosterol (2), campesterol (3), nonadecyl *p*-coumarate (18), araquidyl *p*-coumarate (19), heneicosyl *p*-coumarate (20), coumarin (6) and *p*-coumaric acid (9). The compounds (18), (19) and (20) have never been isolated from a species of the genus *Bauhinia* previously. In addition, there are reports of the compound (19) as an inhibitor of the enzyme DNA isomerase. The crude extract showed activity on the model for the assessment of antinociceptive activity and anti-inflammatory of formalin and the treatment of 3mg/kg reduced 40.34% the animal response only in phase 2. There were no statistically significant differences between the results of the tests of the field open and the hotplate, between the treatments and the negative control. The crude extract showed activity in reducing edema caused by carrageenan, a dose-response.

Key-words: *Bauhinia glabra* Jacq., *p*-coumarate; anti-inflammatory; antioxidant; phytosterols.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1.OBJETIVO GERAL	25
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1.CONSIDERAÇÕES SOBRE ETNOFARMACOLOGIA E FITOTERÁPICOS	27
3.2.CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE	29
3.2.1. Considerações sobre o Gênero <i>Bauhinia</i>	30
3.2.2. Considerações sobre a Espécie <i>Bauhinia glabra</i> Jacq., Fabaceae	32
3.3.CONSIDERAÇÕES SOBRE O METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL.....	35
3.3.1. Considerações Sobre a Biossíntese e Propriedades Biológicas de Fitoesteróis.....	37
3.3.2. Considerações Sobre a Biossíntese e Propriedades Biológicas de Cumarinas.....	39
3.4.CONSIDERAÇÕES SOBRE OXIDAÇÕES BIOLÓGICAS E O POTENCIAL ANTIOXIDANTE	40
3.5.CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1.MATERIAL	48
4.1.1. Processamento do Material Vegetal	48
4.1.2. Reagentes e Solventes.....	49
4.1.3. Equipamentos.....	49
4.2.MÉTODOS.....	49
4.2.1. Protocolo para a Obtenção do Extrato Bruto e Frações dos troncos de <i>Bauhinia glabra</i> Jacq., Fabaceae	51
4.2.2. Protocolos em Análise Fitoquímica.....	52
4.2.2.1. Detecção dos Principais grupos de Metabólitos Secundários	52
4.2.2.2. Quantificação do Conteúdo Total de Clorofilas A e B, e Carotenoides.....	53
4.2.2.3. Quantificação do Conteúdo Total de Fenólicos	53
4.2.2.4. Quantificação do Conteúdo Total de Fitoesteroides	54

4.2.2.5. Quantificação do Conteúdo Total de Flavonoides	54
4.2.2.6. Quantificação do Conteúdo Total de Antocianidinas	55
4.2.2.7. Quantificação do Conteúdo Total de Taninos.....	55
4.2.2.8. Protocolos para o Isolamento e Identificação dos Fitoconstituintes	56
4.2.3. Protocolos para a Avaliação do Potencial Biológico <i>in vitro</i>	57
4.2.3.1. Avaliação do Potencial Antioxidante pela Captura de Hidrogênio pelo Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	57
4.2.3.2. Avaliação do Poder Redutor Frente ao Complexo do Fosfomolibdênio	58
4.2.3.3. Avaliação do Índice de Inibição da Peroxidação Lipídica pelo Método do TBARS.....	58
4.2.3.4. Avaliação da Recuperação do Conteúdo de Meta Hemoglobina em Eritrócitos	59
4.2.3.5. Avaliação do Potencial de Letalidade a <i>Artemia salina</i>	60
4.2.3.6. Avaliação do Potencial Hemolítico.....	60
4.2.4. Protocolos para Avaliação do Potencial Anti-inflamatório e Antinociceptivo <i>in vivo</i>	61
4.2.4.1. Aspectos Éticos	61
4.2.4.2. Animais	62
4.2.4.3. Amostras Ensaçadas.....	62
4.2.4.4. Avaliação da Nocicepção Induzida por Injeção Intraplantar de Formalina ...	62
4.2.4.5. Avaliação da Capacidade Locomotora: Teste do Campo Aberto (<i>Open Field</i>).....	63
4.2.4.6. Avaliação da Nocicepção Térmica Sobre a Placa Quente	63
4.2.4.7. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória pelo Modelo do Edema de Pata Induzido por Carragenina	64
4.2.4.8. Grupos Experimentais e Análises Estatísticas	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. RESULTADOS PARA OS PROTOCOLOS EM ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	66
5.1.1. Rendimento do Processo de Extração.....	66
5.1.2. Resultados Obtidos nas Análises de Detecção dos Principais Grupos de Metabólitos Secundários	67
5.1.3. Resultados Obtidos na Quantificação dos Principais Grupos de Metabólitos.....	68
5.1.4. Separação e Identificação dos Fitoconstituintes.....	70

5.1.4.1. Separação e Identificação dos Fitoconstituintes da (FH).....	70
5.1.4.2. Separação e Identificação dos Fitoconstituintes da (FC).....	87
5.1.4.3. Separação e Identificação dos Fitoconstituintes de (FA).....	90
5.2.RESULTADOS PARA A AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO <i>in vitro</i>	94
5.2.1. Resultados Referentes aos Ensaios para a Avaliação do Potencial Antioxidante.....	94
5.2.1.1. Resultados Obtidos para a Avaliação do Potencial Antioxidante pelo Método do DPPH	95
5.2.1.2. Resultados Obtidos para a Avaliação do Poder Redutor pelo Método do Fosfomolibdênio	96
5.2.1.3. Resultados Obtidos para a Avaliação do Índice de Inibição da Peroxidação Lipídica pelo Método do TBARS	97
5.2.1.4. Resultados Obtidos para a Avaliação do Conteúdo Total de Meta Hemoglobina	98
5.2.1.5. Análise de Correlação Multivariada entre as Características Químicas do (EB) e frações de <i>Bauhinia glabra</i> Jacq., Fabaceae e o Potencial Antioxidante	99
5.2.2. Resultados Obtidos na Avaliação da Letalidade causada pelo (EB) e frações de <i>Bauhinia glabra</i> Jacq., Fabaceae sobre o Microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	104
5.2.3. Resultados Obtidos para as Análises do Potencial Hemolítico das Amostras (EB) e frações de <i>Bauhinia glabra</i> Jacq., Fabaceae	105
5.3.RESULTADOS OBTIDOS PARA AS ANÁLISES DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO <i>in vivo</i> PARA O (EB) DE <i>B. glabra</i> Jacq., Fabaceae	106
5.3.1. Resultados Obtidos na Avaliação das Propriedades Anti-Inflamatórias para o (EB) de <i>Bauhinia glabra</i> Jacq., Fabaceae pelo Método da Formalina	106
5.3.2. Resultados Obtidos na Avaliação do Comprometimento Motor Apresentado pelos Animais para o (EB) pelo Método do Campo Aberto	111
5.3.3. Resultados Obtidos na Avaliação da Atividade Antinociceptiva por Estímulo Térmico – Placa Quente.....	112
5.3.4. Resultados Obtidos na Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória pela Medida do Edema de Pata Induzido por Carragenina	113
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
REFERÊNCIAS.....	118
ANEXOS	130

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE PLANTAS DO GÊNERO <i>Bauhinia</i> .	30
FIGURA 2: FOTOGRAFIA DOS TRONCOS DA ESPÉCIE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.	33
FIGURA 3: DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE <i>B. glabra</i> JACQ., AO REDOR DO MUNDO.....	33
FIGURA 5: ROTA METABOLICA RESUMIDA PARA A FORMAÇÃO DE FITOESTEROIDES.	38
FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DE 1,2-BENZOPIRONA.....	39
FIGURA 7: ROTA BIOSINTÉTICA RESUMIDA PARA A FORMAÇÃO DE CUMARINAS.....	40
FIGURA 8: MECANISMO DE CAPTURA DE RADICAIS LIVRES PELO DPPH.....	42
FIGURA 9: REAÇÃO QUÍMICA ENTRE O MALONALDEÍDO E O ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.....	43
FIGURA 10: REAÇÕES BIOQUÍMICAS QUE LEVAM À FORMAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.	44
FIGURA 11: FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE	48
FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DESTE TRABALHO.	50
FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO DO APARATO PARA EXTRAÇÃO EM SOXHLET.	51

FIGURA 14: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200MHz) OBTIDO EM CDCl_3 PARA O SÓLIDO (FH-01).	72
FIGURA 15: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C , 50MHz, OBTIDO EM CDCl_3 PARA O SÓLIDO (FH-01).	73
FIGURA 16: NUMERAÇÃO ATUALMENTE ACEITA PARA O FITOESTEROIDE ESTIGMASTEROL (1).	74
FIGURA 17: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTEROIDES ISOLADOS DE <i>Bauhinia glabra</i> Jacq., Fabaceae.....	76
FIGURA 18: ESPECTRO DE RMN DE ^1H , 200MHz, OBTIDO EM CDCl_3 PARA O SÓLIDO (FH-02).	77
FIGURA 19: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C , 50MHz, OBTIDO EM CDCl_3 PARA O SÓLIDO (FH-02).	78
FIGURA 21: ESTRUTURA QUÍMICA DO CÁTION ALÍLICO ($m/z=147$) OBTIDO PELA FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS DA AMOSTRA (FH-02)	80
FIGURA 22: ESPECTRO DE MASSAS REALIZADO NO MODO POSITIVO PARA O COMPOSTO <i>p</i> -CUMARATO DE NONADECILA (18).	81
FIGURA 23: ESPECTRO DE MASSAS REALIZADO NO MODO POSITIVO PARA O COMPOSTO <i>p</i> -CUMARATO DE ARAQUIDILA (19).....	82
FIGURA 24: ESPECTRO DE MASSAS REALIZADO NO MODO POSITIVO PARA O COMPOSTO <i>p</i> -CUMARATO DE HENEICOSILA (20).	83
FIGURA 25: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁLCOOIS GRAXOS RESPONSÁVEIS PELA PERDA NEUTRA NAS ANÁLISES DE MASSA, REALIZADAS NO MODO POSITIVO.	84
FIGURA 26: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÉSTERES DO ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO (18), (19), E (20).....	85

FIGURA 27: ESPECTRO DE RMN DE ^1H , 200MHz, OBTIDO EM MeOD PARA O SÓLIDO (FC-01).	88
FIGURA 28: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C , 50MHz, OBTIDO EM MeOD PARA O SÓLIDO (FC-01).	89
FIGURA 29: ESPECTRO DE RMN DE ^1H , 200MHz, OBTIDO EM MeOD PARA O SÓLIDO (FA-01).....	92
FIGURA 30: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C , 50MHz, OBTIDO EM MeOD PARA O SÓLIDO (FA-01).....	93
FIGURA 31: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DO DPPH PARA O (EB) E FRAÇÕES DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....	96
FIGURA 32: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DO PODER REDUTOR PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO PARA O (EB) E FRAÇÕES <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....	97
FIGURA 33: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELO MÉTODO DO TBARS PARA O (EB) E FRAÇÕES <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....	98
FIGURA 34: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DA RECUPERAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE META HEMOGLOBINA PARA O (EB) E FRAÇÕES <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE	99
FIGURA 35: APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS COMPARADOS PARA OS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA O (EB) E FRAÇÕES DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....	100
FIGURA 36: SIMILARIDADE QUÍMICA EXISTENTE ENTRE O (EB) E FRAÇÕES DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE RELACIONADA COM A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS	101
FIGURA 37: ANÁLISE DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS ENTRE OS TEORES DE METABÓLITOS E AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES.....	102

FIGURA 38: ANÁLISE DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS ENTRE OS TEORES DE METABÓLITOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DO GRUPO 1 E OS RESULTADOS DOS ENSAIOS DO TBARS E DO PODER REDUTOR PELO FOSFOMOLIBDÊNIO.	103
FIGURA 39: APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O POTENCIAL HEMOLÍTICO CAUSADO PELO (EB) E FRAÇÕES DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE E FRAÇÕES.....	106
FIGURA 40: CURSO TEMPORAL OBTIDO PARA O ENSAIO DA FORMALINA FRENTE AO (EB) DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....	108
FIGURA 41: RESULTADOS OBTIDOS FRENTE O ENSAIO DO CAMPO ABERTO PARA O (EB) DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....	112
FIGURA 42: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE NOCICEPÇÃO TÉRMICA PELO MÉTODO DA PLACA QUENTE PARA O EXTRATO BRUTO DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....	113
FIGURA 43: CURSO TEMPORAL OBTIDO PARA O ENSAIO DO EDEMA DE PATA PELO MÉTODO DA CARRAGENINA FRENTE AO (EB) DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.	114
FIGURA 44: ÁREA SOBRE A CURVA NORMALIZADA PARA 100% DE EDEMA APRESENTADO PELO CONTROLE, PARA O ENSAIO DA CARRAGENINA DE (EB) DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - METABÓLITOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Bauhinia</i>32	32
TABELA 2- RESULTADOS DAS ANÁLISES BROMATOLÓGICAS PARA A ESPÉCIE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.34	34
TABELA 3 - RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE E CONTEÚDOS TOTAIS DE METABÓLITOS DETERMINADOS66	66
TABELA 4 - RESULTADOS DAS ANÁLISES FITOQUÍMICAS PRELIMINARES DO EXTRATO BRUTO DOS TRONCOS DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE68	68
TABELA 5 - CONTEÚDO TOTAL DOS METABÓLITOS PESQUISADOS POR FRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE.....69	69
TABELA 6 - DADOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C PARA AS MOLÉCULAS DE ESTIGMASTEROL(1), β-SITOSTEROL (2) E CAMPESTEROL (3) OBTIDOS E COMPARADOS COM A LITERATURA.75	75
TABELA 7 - RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO (EB) E FRAÇÕES DE <i>Bauhinia</i> <i>glabra</i> JACQ., FABACEAE.....95	95
TABELA 8 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE LETALIDADE FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i> REALIZADO PARA O (EB) E FRAÇÕES DE <i>Bauhinia glabra</i> JACQ., FABACEAE..... 105	105
TABELA 9 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO NÚMERO DE MOVIMENTOS BRUSCOS COM A PATA, POR TRATAMENTO, PARA O ENSAIO DA FORMALINA 107	107

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>B. glabra</i> JACQ., FABACEAE.	34
QUADRO 2: PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, ALGUNS DE SEUS PONTENCIAIS BIOLÓGICOS JÁ DESCRITOS, E ALGUMAS DAS ESPÉCIES CLÁSSICAS ESTUDADAS.....	36

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

μg	micrograma
β	beta
δ	deslocamento químico
ABAP	Cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano
BHT	butil hidroxi tolueno
CCD	cromatografia em camada delgada
DL _{50%}	dose letal para 50%
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
EB	extrato bruto
ESI	ionização do tipo Eletrospray
FA	fração acetato de etila
FC	fração clorofórmio
FH	fração hexano
FM	fração metanol
FR	fração remanescente
g	grama
Hz	hertz
IC _{50%}	índice de captura de 50%
IPL%	porcentagem de inibição da peroxidação lipídica
Kg	kilograma
M	molar
MHz	megahertz
m/m	massa/massa
mL	mililitro
nm	nanômetro
ppm	parte por milhão
RMN de ^1H	ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
RMN de ^{13}C	ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
rpm	rotação por minuto

SDS	dodecil sulfato de sódio
TAnthC	conteúdo total de Antocianidinas
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	“thiobarbituric acid reactive species”
TCarC	conteúdo total de Carotenoides
TChlCa	conteúdo total de Clorofila A
TChlCb	conteúdo total de Clorofila B
TMS	tetrametilsilano
TPheC	conteúdo total de Fenólicos
TPhyC	conteúdo total de Fitoesteróis
TTanC	conteúdo total de Taninos
UV	ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para o tratamento de doenças vem sendo relatado desde os mais remotos tempos da humanidade. A utilização de espécies vegetais para o tratamento de doenças, juntamente com o conhecimento acumulado ao longo dos séculos pelas populações que as utilizam, fazem parte do que se conhece hoje como a ciência da Etnofarmacologia (SIMÕES *et al.*, 1998).

Cada vez mais pesquisadores no mundo tem atestado as atividades biológicas destas espécies relatadas por estas populações, contribuindo assim para a descoberta de novos agentes terapêuticos que tem servido de modelo para síntese e protótipo de novas classes terapêuticas. Mesmo as relações estrutura química/atividade biológica vêm sendo melhor compreendidas pelo isolamento de séries homólogas de compostos e o ensaio de suas propriedades biológicas (RATES, 2001).

A utilização deste tipo de terapêutica em âmbito mundial ao longo dos séculos vem ganhando espaço e vem se tornando mais difundida por ser considerada de baixo custo e bastante acessível (RATES, 2001; MICHELIN *et al.*, 2005).

Muitos esforços vêm sendo realizados para a padronização de aspectos de qualidade referentes às matérias-primas de origem vegetal, bem como novos esforços surgem a cada ano quanto à tecnologia aplicada ao desenvolvimento de formas farmacêuticas capazes de modular as características farmacocinéticas destes medicamentos.

Porém somente uma pequena parte da biodiversidade mundialmente disponível já foi estudada. Este fato descreve um cenário em que as etapas finais do processo de obtenção de novos medicamentos estão aprimoradas, mas a fase de descoberta de novas moléculas é o evento limitante ao crescimento do arsenal terapêutico.

No Brasil a utilização de plantas medicinais é difundida há anos, devido à grande influência das culturas africanas e indígenas. A contribuição dos escravos africanos se deu através de sua cultura, em que plantas com propriedades terapêuticas foram descobertas ao longo dos anos e trazidas até nosso continente. Mesmo as comunidades indígenas nativas brasileiras vêm passando seus

conhecimentos sobre plantas medicinais por meio de ritos religiosos, de geração para geração (TOMAZZONI, NEGRELLE E CENTA, 2006).

Atualmente os fitoterápicos constituem uma parcela significativa dentre os medicamentos que são consumidos pela população brasileira. Tanto a população rural, quanto a das grandes cidades fazem a utilização deste tipo de terapêutica. Portanto o consumo de fitoterápicos constitui uma parcela significativa de mercado, tornando-se um importante foco para o desenvolvimento econômico do país (KLEIN *et al.*, 2005).

A utilização de plantas como matéria-prima para o desenvolvimento de medicamentos é baseada na capacidade que as espécies vegetais possuem de biossintetizar substâncias químicas através de seu metabolismo secundário. Essas substâncias provenientes deste metabolismo são produzidas com funções diversas sobre a fisiologia da espécie, como por exemplo a proteção contra predadores, a proteção contra aspectos ambientais e como auxiliar na polinização para a propagação da espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Os sistemas de garantia de qualidade preconizam que toda a matéria-prima de origem vegetal seja rigorosamente vistoriada, a fim de promover a produção de medicamentos de qualidade. Para tanto, o conhecimento do perfil químico destas matérias-primas possibilita o desenvolvimento de metodologias em controle de qualidade baseadas em marcadores químicos e minimizando erros (FISCHER, 2005).

Além disto o conhecimento do perfil químico destas espécies utilizadas faz com que se reduza muito o risco de interação medicamentosa, além de possibilitar a elaboração de uma poderosa ferramenta aos centros de informações toxicológicas, impactando na saúde da população brasileira.

Há muito tempo se sabe que as indústrias farmacêuticas preferem os produtos de síntese em detrimento aos de origem natural, pela facilitação que estes proporcionam aos processos de desenvolvimento e controle de qualidade dos medicamentos preparados (RASKIN *et al.*, 2002). Porém como já descrito, os produtos naturais se mantem como base para o desenvolvimento de novos fármacos e muito interesse ainda recai sobre este tipo de fonte de moléculas, renovável, não poluente e sustentável. Neste contexto, faz sentido à busca constante por novas fontes de moléculas, seu isolamento e o mapeamento farmacológico de possíveis atividades biológicas destas substâncias.

Este estudo tem como objetivo a avaliação do perfil fitoquímico, o estudo do potencial antioxidante, a avaliação preliminar de toxicidade, e a determinação da atividade anti-inflamatória do extrato bruto hidroalcoólico e frações dos troncos da espécie vegetal *Bauhinia glabra* Jacq. (Fabaceae), popularmente conhecida como “Escada-de-macaco”, que cresce livremente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil.

A ideia central deste trabalho envolve a detecção de novas substâncias, a determinação do conteúdo total de seus principais grupos de metabólitos, a avaliação de possíveis atividades anti-inflamatória/antinociceptiva, e a correlação entre estes dados químicos e o potencial terapêutico que a espécie possa apresentar.

Trata-se de uma proposta desafiadora, uma vez que poucos grupos de pesquisa no Brasil conseguem abranger de maneira eficaz as várias linhas de pesquisa necessárias para a extração, a caracterização da matéria-prima vegetal, e a triagem de suas potencialidades biológicas em modelos *in vitro* e *in vivo*.

O interesse por estudar esta espécie se deve ao fato de que muitas espécies do gênero *Bauhinia* apresentam atividade biológica e por não existirem estudos químicos ou biológicos sobre ela.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil fitoquímico, o potencial antioxidante, a toxicidade preliminar e as atividades anti-inflamatória/antinociceptiva do extrato obtido a partir dos troncos da espécie *Bauhinia glabra* Jacq. (Fabaceae).

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a coleta e identificação botânica dos troncos de *B. glabra*;
2. Obter o extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* e frações semipurificadas (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente);
3. Detectar e quantificar os principais grupos de metabólitos no extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* e frações semipurificadas;
4. Isolar e identificar os constituintes químicos presentes nas frações semipurificadas obtidas a partir do extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra*;
5. Avaliar o potencial antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* e frações semipurificadas pelo método da captura de elétrons pelo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH);
6. Determinar o poder redutor do extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* e frações semipurificadas sobre o complexo do fosfomolibdênio;

7. Quantificar a inibição da peroxidação lipídica provocada pelo extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* e frações semipurificadas pelo método das espécies reativas frente ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
8. Avaliar o poder redutor do extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* e frações semipurificadas frente a meta-hemoglobina em suspensão de eritrócitos;
9. Quantificar o potencial hemolítico e de provocar letalidade, provocado pelo extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* e frações semipurificadas frente ao microcrustáceo *Artemia salina* como parâmetros preliminares de toxicidade;
10. Avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* pelo modelo da formalina e do edema de pata induzido por carragenina;
11. Determinar se há comprometimento motor nos animais tratados com o extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* pelo método do campo aberto;
12. Avaliar o potencial antinociceptivo do extrato bruto hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra* pelos modelos da placa quente;
13. Realizar análises estatísticas de correlação multivariada entre os resultados das análises fitoquímicas e os ensaios de potencial biológico *in vitro* realizados para o extrato bruto e frações semipurificadas do extrato hidroalcoólico dos troncos de *B. glabra*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE ETNOFARMACOLOGIA E FITOTERÁPICOS

Simões *et al.* (1998) definem biodiversidade como a variedade e a variabilidade que existe entre os organismos vivos e as complexidades biológicas nas quais elas ocorrem. As plantas são utilizadas há muito tempo como medicamentos e as florestas tropicais representam um rico território de espécies com potencial terapêutico. Este potencial torna-se enorme porque apenas uma pequena parcela destas espécies vegetais foi investigada do ponto de vista farmacológico.

A descoberta de extratos vegetais promissores, pelo relato das diversas etnias que compõe uma população, além do isolamento de fitoconstituintes destas espécies e a comprovação de suas potencialidades biológicas através de modelos experimentais, tem sido a base da etnofarmacologia.

O emprego destas preparações é geralmente feito para auxiliar as terapêuticas disponíveis para o tratamento de diversas patologias. Este emprego tem seu embasamento tradicional, pois se tratam de terapêuticas de baixo custo e de fácil obtenção (RATES, 2001; RASKIN *et al.*, 2002). Entretanto, há muito se tem a consciência de que estas espécies podem apresentar uma ampla gama de metabólitos secundários, com as mais variadas propriedades biológicas, terapêuticas, ou mesmo tóxicas. Neste sentido justifica-se a necessidade de pesquisas sobre as propriedades biológicas, bem como a composição química das espécies vegetais, para a sua utilização racional no desenvolvimento de novos medicamentos.

Neste cenário pode-se destacar a posição de vanguarda que o Brasil ocupa com a criação, pelo Ministério da Saúde em 1982 (BRASIL, 2001), do Programa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. A criação deste programa teve como objetivo a avaliação química e farmacológica das espécies utilizadas pela população brasileira. Desta forma pôde-se obter a certificação de potencial farmacológico e toxicidade baixa das espécies que eram utilizadas, e as que atenderam os requisitos puderam ser incorporadas à Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME).

De lá para os dias atuais muitas normatizações e incentivos foram instituídos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para padronizar e utilizar com racionalidade este conhecimento tradicional.

O ano de 2004 foi um marco no que se relaciona à padronização e às políticas de medicamentos fitoterápicos. Neste ano foram estabelecidas novas normas para o registro destes medicamentos, como a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 de 16 de março de 2004. Esta normativa trouxe uma nova abordagem para o registro de medicamentos fitoterápicos que passava a exigir a comprovação da eficácia e segurança através de métodos analíticos validados (BRASIL, 2004a).

Neste mesmo sentido a Resolução de Exercício (RE) nº 88 de 16 de março de 2004 determinou a publicação da Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de Fitoterápicos, tornando ainda mais padronizada a produção e o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004b).

Naquele ano esta lista veio exatamente ao encontro de outras legislações que buscavam controle total de processo e visavam a garantia da qualidade através da reprodutibilidade.

As espécies com ampla utilização tradicional foram então incluídas na RE nº 89 de 16 de março de 2004, que determinou a publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos, trazendo algumas modificações no processo de registro, acelerando este processo, e incentivando o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos no país (BRASIL, 2004c). Também pela publicação da RE nº 90 de 16 de março de 2004, que determinou a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, a segurança na utilização deste tipo de terapêutica ganhou ainda mais força (BRASIL, 2004d).

Entre os anos de 2006 e 2008, com a publicação das normativas Decreto nº. 813 de 22 de junho de 2006 (que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências), RDC nº 95 de 11 de dezembro de 2008 (que regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos) e a Instrução Normativa nº 5 de 11 de dezembro de 2008 (que determina a publicação da lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado) a legislação se atualiza e define critérios ainda mais rigorosos, além de incluir novas espécies ao sistema de registro simplificado. Cabe salientar que todas estas medidas colocam o Brasil em posição de

destaque com relação à produção e ao controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos comercializados.

Simões *et al.* (1998) descrevem ainda que para o desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos muitos estudos se fazem necessários. Pode-se citar o estudo botânico, a fim de evitar equívocos e acidentes como a utilização de um táxon morfológicamente semelhante. Também se faz necessário o estudo químico e farmacológico dos compostos produzidos pelas espécies a fim de identificar os responsáveis pelos efeitos terapêuticos, como possíveis marcadores.

3.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae é a terceira maior dentre as Angiospermas e apresenta cerca de 18.000 espécies, que estão distribuídas em aproximadamente 727 gêneros em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS *et al.*, 2005). Trata-se de uma família de angiospermas de importância econômica pronunciada pela produção de extratos vegetais medicinais, por serem espécies ornamentais, pelo potencial forrageiro, como produtoras de óleos comestíveis, além da produção de alimentos (SALINAS, 1992; SILVA, 2011).

Sua distribuição é bastante cosmopolita e está bem representada nas regiões com climas tropicais, subtropicais e mesmo em regiões temperadas (LEWIS *et al.*, 2005). Na caatinga é a família de plantas com maior diversidade e está representada por cerca de 300 espécies, das quais 144 são endêmicas (QUEIROZ, 2002; 2006a; 2006b).

Muitos gêneros pertencentes a esta família têm atividades biológicas das mais variadas já descritas. Pode-se citar como um exemplo a espécie *Indigofera microcarpa* que demonstrou possuir atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* (CHIAPPETA *et al.*, 1983) e atividade citotóxica com a dose letal para 50% das células (DL_{50%}) sendo 3mg/mL (NASCIMENTO, MELO E CHIAPPETA, 1985).

Muitos gêneros pertencentes à família Fabaceae também vem sendo estudados com relação as suas propriedades antifúngicas. Um gênero interessante é

Pterogyne. A análise fitoquímica da espécie *Pterogyne nitens* revelou a presença de compostos com pronunciada atividade antifúngica.

Estes resultados encontrados por pesquisadores de diferentes países motivam cada vez mais o interesse em se estudar aspectos fitoquímicos relacionados às espécies da família Fabaceae.

3.2.1. Considerações sobre o Gênero *Bauhinia*

Um gênero que se destaca dentre os gêneros da família Fabaceae é *Bauhinia*, que pertence à subfamília Caesalpinioideae (WUNDERLIN, LARSEN E LARSEN, 1981; LEWIS, 2005). Este gênero é pantropical, com ampla distribuição nos continentes Asiático, Africano e alguns países da América Latina, conforme a (FIGURA 1). O trabalho de Wunderlin (1983) classificou cerca de 300 espécies de *Bauhinia* em 22 seções e 30 séries.

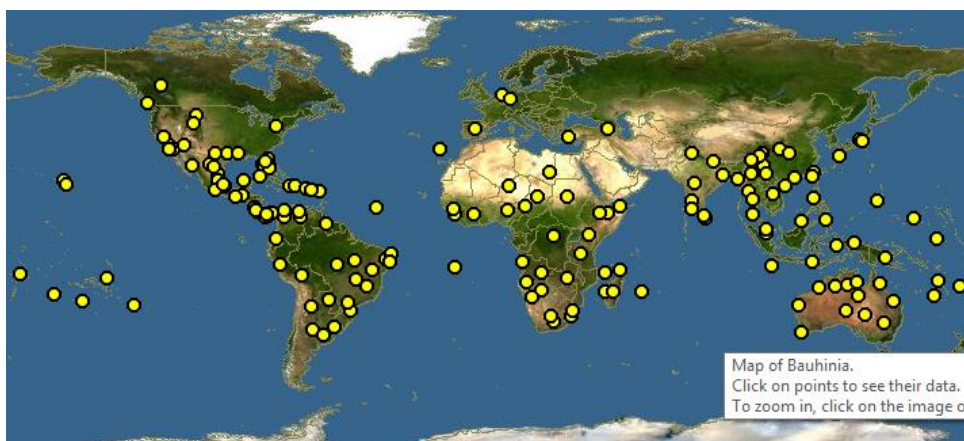


FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE PLANTAS DO GÊNERO *Bauhinia*.
NOTA: ESTÃO DESTACADAS EM AMARELO AS REGIÕES ONDE CRESCEM AS ESPÉCIES DESTE GÊNERO AO REDOR DO MUNDO.

FONTE: Adaptado de <http://www.discoverlife.org/> (2014)

Há bastante tempo as espécies pertencentes a este gênero vem despertando o interesse de pesquisadores em todo o mundo e muitas destas espécies apresentam propriedades biológicas nos mais variados modelos.

Pode-se destacar como um exemplo importante deste gênero a espécie *Bauhinia cheilantha*, que há bastante tempo apresenta pronunciada importância medicinal. Suas partes aéreas são amplamente empregada nas práticas caseiras da medicina popular para o tratamento de diabetes (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2005) e também é utilizada no semiárido brasileiro por seus atributos anti-inflamatórios, sedativos, antiparasitários, digestivos e expectorantes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2011).

Outra espécie deste gênero que desperta o interesse de pesquisadores é *Bauhinia purpurea*. O extrato de suas folhas foi investigado quanto às suas propriedades antiproliferativa e antioxidante (ZAKARIA *et al.*, 2011), apresentando resultados bastante significativos.

Mais um bom exemplo da diversidade de potencial biológico apresentado pelo gênero *Bauhinia* é a espécie *Bauhinia candicans*. O extrato de suas folhas foi avaliado com relação a sua utilização no tratamento do *Diabetes mellitus* e realmente mostrou efeito hipoglicemiante em cobaias, além do potencial de provocar relaxamento dos anéis da aorta (MARCONDES E ALARCÓN ENOS, 2010).

Dentro deste contexto pode-se destacar ainda *Bauhinia forficata* como provavelmente a espécie mais estudada deste gênero. Marques *et al.* (2013) realizaram uma revisão sobre a utilização desta espécie como coadjuvante no tratamento de *Diabetes mellitus*. Estes pesquisadores relataram que as propriedades desta espécie contra o *Diabetes mellitus* podem ser atribuídas à presença dos heterosídeos dos flavonoides canferol e quercetina, que estão presentes em suas folhas.

Este artigo de revisão também destaca os estudos realizados sobre esta espécie no que tange à atividade antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante e antiedematogênica. Os autores verificaram que o amplo emprego da espécie *B. forficata* no tratamento terapêutico de *Diabetes mellitus* encontra-se pautado em uma pluralidade de estudos realizados com diferentes modelos experimentais.

Em seus trabalhos de revisão, Silva e Cechinel-Filho (2002) apresentaram uma ampla gama de metabólitos secundários já isolados de plantas deste gênero, apresentados na (TABELA 1). Entre estes metabólitos podemos destacar a presença de fitoesteroides, triterpenos, cumarinas, flavonoides, cianidinas, antraquinonas, além de alcaloides e fenólicos simples.

TABELA 1 - METABÓLITOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bauhinia*.

Espécie	Classe	Composto
<i>B. candicans</i>	Esteroides	Sitosterol; Campesterol; Estigmasterol; Colesterol
	Flavonoides	Kaempferol 3-O-rutinosídeo;
<i>B. forficata</i>	Flavonoides	Kaempferitrina; Kaempferol-3-O-Diramínosídeo
	Esteroides	Sitosterol
<i>B. guianensis</i>	Esteroides	Sitosterol; Estigmasterol
	Quinonas	Lapachol; Di-hidro-lapachona
<i>B. manca</i>	Esteroides	Sitosterol; Sitosterol-3-O-D-glicosídeo
	Benzenoides	Ácido cinâmico
	Flavonoides	Apigenina; Luteolina 5,3-dimetoxi; Kaempferol;
<i>B. purpurea</i>	Flavonoides	Isoquercitrina; Quercetina; Astragalina
<i>B. splendens</i>	Flavonoides	Bausplendina; Quercetina; Rutina
	Esteroides	Sitosterol; Estigmasterol
<i>B. vahlii</i>	Esteroides	Campesterol; Estigmasterol; Sitosterol
	Flavonoides	Quercetina; Quercetina-3-glucosídeo; Kaempferol
	Triterpenoides	Ácido betulínico

FONTE: Adaptado de SILVA E CECHINEL FILHO, 2002.

Pode-se perceber, pela da análise dos dados da (TABELA 1), que este gênero tem seu metabolismo secundário bastante diversificado, produzindo várias classes de metabólitos como antraquinonas, terpenoides, fenólicos simples e principalmente flavonoides e fitoesteróis. Cabe salientar que estas moléculas secundárias isoladas de espécies do gênero *Bauhinia* possuem atividades biológicas descritas há bastante tempo, como antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e hipoglicemiante.

3.2.2. Considerações sobre a Espécie *Bauhinia glabra* Jacq., Fabaceae

A espécie *Bauhinia glabra* Jacq., Fabaceae conhecida como “escada de macaco” e “cipó-de-escada”, é uma leguminosa de troncos suspensos (ajustados simulando uma escada) nativa da bacia do rio Parnaíba. A (FIGURA 2) apresenta a fotografia das partes aéreas desta espécie.



FIGURA 2: FOTOGRAFIA DOS TRONCOS DA ESPÉCIE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.
FONTE: Adaptado de MISSOURI BOTANICAL GARDEN (2014).

É encontrada com bastante frequência em áreas de pastagem nativa, caracterizadas como floresta mista de babaçu (BATISTA *et al.*, 1999). Esta espécie tem a sua distribuição bastante restrita, sendo encontrada somente nas américas do sul e central, conforme a (FIGURA 3).

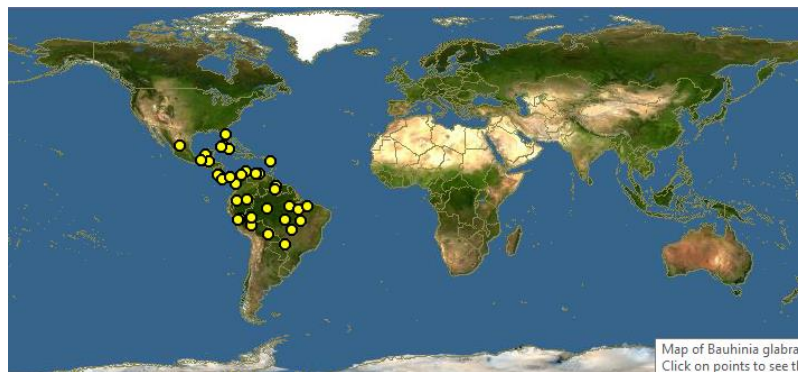


FIGURA 3: DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE *B. glabra*, AO REDOR DO MUNDO.
NOTA: OS PONTOS AMARELOS REPRESENTAM OS PAÍSES EM QUE ESTA ESPÉCIE CRESCE.
FONTE: Adaptado de <http://www.discoverlife.org/> (2014).

Possui como sinónimas botânicas *Bauhinia brachystachya*, *Bauhinia columbiensis*, *Bauhinia cumanensis*, *Bauhinia heterophylla*, *Bauhinia longipetala*, *Bauhinia punctata*, *Bauhinia standleyi*, *Bauhinia storkii*, *Bauhinia suaveolens*, *Binaria cumanensis*, *Binaria hondurensis*, *Binaria longipetala*, *Schnella columbiensis*, *Schnella cumanensis*, *Schnella glabra*, *Schnella heterophylla*, *Schnella longipetala*, *Schnella standleyi* e *Schnella storkii*. Sua classificação foi rediscutida por VAZ (2010),

que enquadrrou esta espécie em um novo gênero como *Phanera glabra*. O (QUADRO 1) apresenta a classificação botânica de *B. glabra*.

Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht.
Ordem	Fabales Bromhead.
Família	Fabaceae Lindl.
Gênero	<i>Bauhinia</i> L.
Espécie	<i>Bauhinia glabra</i>

QUADRO 1: ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE
FONTE: Adaptado de MISSOURI BOTANICAL GARDEN (2014).

Não há dados na literatura sobre estudos em nenhuma das sinonímias supracitadas, e tampouco sobre espécies deste novo gênero *Phanera*. Da mesma maneira, não existem relatos na literatura sobre os grupos de metabólitos secundários e estudos de atividade biológica da espécie *B. glabra* e somente estudos bromatológicos foram realizados pela utilização desta espécie como forragem (BATISTA *et al.*, 1999). A (TABELA 2) apresenta os resultados das análises bromatológicas realizadas por Batista *et al.* (1999).

TABELA 2- RESULTADOS DAS ANÁLISES BROMATOLÓGICAS PARA A ESPÉCIE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

Componente %	Estadio de corte (dias)				
	42	56	70	84	89
Dias	42	56	70	84	89
Matéria Seca	86,15	87,54	90,07	90,21	90,55
Matéria Orgânica	93,2	93,35	94,17	94,42	95,73
Cinzas	6,79	6,65	5,57	4,32	4,26
Proteína Bruta	19,13	18,05	17,83	17,75	17,11
Fibras em detergente ácido	31,24	39,06	42,15	45,65	46,3
Fibras em detergente neutro	46,58	55,29	59,69	63,13	64,95
Celulose	22,3	26,55	27,03	30,07	30,74
Lignina	8,02	11,42	13,92	14,68	15,75
Cálcio	0,24	0,28	0,28	0,31	0,35

DADOS EXPRESSOS EM PORCENTAGEM (m/m)

FONTE: Batista *et al.* (1999)

O estudo de Batista *et al.* (1999) concluiu que o feno de *B. glabra* apresentou teor médio de proteína bruta 17,97% na matéria seca, e constitui-se em um suplemento proteico para ruminantes conforme a (TABELA 2) onde estão apresentados os resultados das análises bromatológicas de *B. glabra*.

3.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE O METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL

Há muito tempo já se conhece o papel evolutivo atribuído aos metabólitos secundários biossintetizados por plantas. Em seus trabalhos de revisão Bourgaud *et al.* (2001) apontaram um substancial aumento no interesse pelo estudo destes tipos de moléculas nos últimos 60 anos.

De acordo com Bourgaud *et al.* (2001) o metabolismo secundário vegetal desempenha um papel importante para a adaptação de plantas aos seus ambientes e também desperta o interesse por se tratar de uma importante fonte de moléculas com potencial biológico e interesse farmacêutico.

O conceito de metabólito secundário pode ser atribuído à Kossel. Este pesquisador foi o primeiro a diferenciar estes compostos daqueles essenciais ao metabolismo energético de uma espécie. Anos depois alguns avanços foram atribuídos à Czapek. De acordo com seus estudos, estes metabólitos poderiam derivar também do metabolismo de nitrogênio, passos estes que ele chamou de “modificações secundárias” (BOURGAUD *et al.*, 2001).

As principais vias do metabolismo secundário vegetal se iniciam a partir da glicose e de dois precursores principais: o ácido chiquímico que origina a via que leva a produção de cumarinas e compostos fenólicos, e o ácido mevalônico que dá origem aos fitoesteroides. Alguns aminoácidos, como a fenilalanina, a lisina e a ornitina, também são relatados como precursores de uma classe importante de metabólitos secundários conhecidos como alcaloides (DEWICK, 2002).

Com o desenvolvimento das técnicas analíticas mais modernas, tais como métodos cromatográficos instrumentais e o desenvolvimento de espectrômetros de RMN de ^1H , de ^{13}C e de massas cada vez mais sensíveis, uma grande quantidade de

moléculas com potencial biológico vem sendo apresentadas à comunidade científica, com as mais variadas atividades biológicas descritas.

As principais classes de metabólitos secundários estão apresentadas no (QUADRO 2), com algumas de suas potencialidades biológicas estudadas e algumas das espécies em que tradicionalmente se encontram estes metabólitos.

CLASSE DE METABÓLITOS	POTENCIAL FARMACOLÓGICO	ESPÉCIES TRADICIONAIS
Fenilpropanoides e terpenoides	Carminativos; Antiespasmódicos; Estimulantes do Sistema Nervoso Central	<i>Eucalyptus globolus</i> ; <i>Mentha piperita</i>
Compostos Fenólicos Simples	Antioxidantes; Antimicrobianos; Antivirais	<i>Cynara scolymus</i> ; <i>Capsicum spp.</i>
Cumarinas	Anticoagulantes; Vasodilatadoras; Anti-inflamatórias, Antidepressivas	<i>Citrus spp.</i> ; <i>Angelica archangelica</i>
Flavonoides	Antioxidantes; Anti-inflamatórios; Antitumorais; Estrogênica	<i>Ginkgo biloba</i> ; <i>Passiflora alata</i> ; <i>Citrus spp.</i>
Taninos	Cicatrizantes; Anti-inflamatórios; Imunomoduladores; Antioxidantes; Antivirais	<i>Hamamelis virginiana</i> ; <i>Stryphnodendron adstringens</i>
Antraquinonas	Laxantes; Leishmanicida, Tripanocida; Antitumoral	<i>Senna alexandrina</i> ; <i>Rhamnus purshiana</i>

QUADRO 2: PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, ALGUNS DE SEUS POTENCIAIS BIOLÓGICOS JÁ DESCRITOS, E ALGUMAS DAS ESPÉCIES CLÁSSICAS
FONTE: ADAPTADO DE SIMÕES *et al.* (1998).

A revisão desta tese enfoca os aspectos de biossíntese dos fitoesteroides e de cumarinas por tratarem-se de classes reportadas no gênero *Bauhinia* e identificados em de *B. glabra* durante esta pesquisa.

3.3.1. Considerações Sobre a Biossíntese e Propriedades Biológicas de Fitoesteróis

Fitoesteroides são moléculas lipofílicas derivadas do isopreno e biossintetizadas por plantas como componentes de membrana. De acordo com um grande número de publicações esta classe de compostos já foi isolada a partir de muitas espécies vegetais (GRUNWALD, 1980; PIIRONEN *et al.*, 2000) e provavelmente existe em todas as espécies de gimnospermas e angiospermas (GUL E AMAR, 2006).

Conforme mencionado esta classe de moléculas possui importância biológica como componentes de membranas celulares e também como precursores para a biossíntese de fitormônios (GREBBÉ *et al.*, 2003). A (FIGURA 4) apresenta a estrutura química dos fitoesteroides estigmasterol (1), β -sitosterol (2) e campesterol (3).

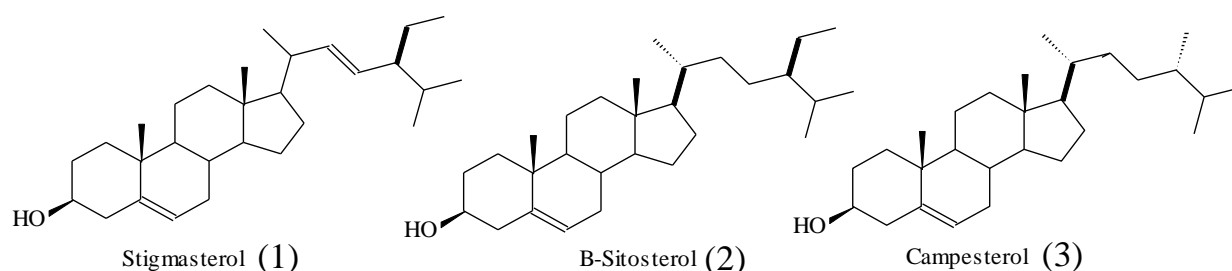


FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DOS FITOESTERÓIDES ESTIGMASTEROL (1), β -SITOSTEROL (2) E CAMPESTEROL (3).
FONTE: O autor (2014).

Esta classe de substâncias tem sua origem no metabolismo do ácido mevalônico e tem como característica marcante o anel ciclopentanoperidrofenantreno com uma cadeia lateral em C-17 (BARTNIKOWSKA, 2009). Em 2006 Gul e Amar citaram a existência de pelo menos 40 fitoesteroides diferentes, sendo estigmasterol (1), β -sitosterol (2), e Campesterol (3) os mais tipicamente encontrados.

Conforme pode ser observado na (FIGURA 5) o ácido mevalônico (4) é formado pela condensação aldólica entre uma unidade de acetil-CoA e outra unidade de acetoacetil-CoA. Após este evento o produto desta condensação sofre hidrólise com subsequente redução para formar o ácido mevalônico (4), que é então fosforilado e descarboxilado para gerar um composto conhecido como isopreno ativo (5).

Este isopreno ativo fosforilado é a unidade monomérica responsável pela formação de derivados terpenoides, como por exemplo fitoesteroides. Após sucessivas reações de polimerização tem-se a formação de esteroides e triterpenos (SIMÕES *et al.*, 1998).

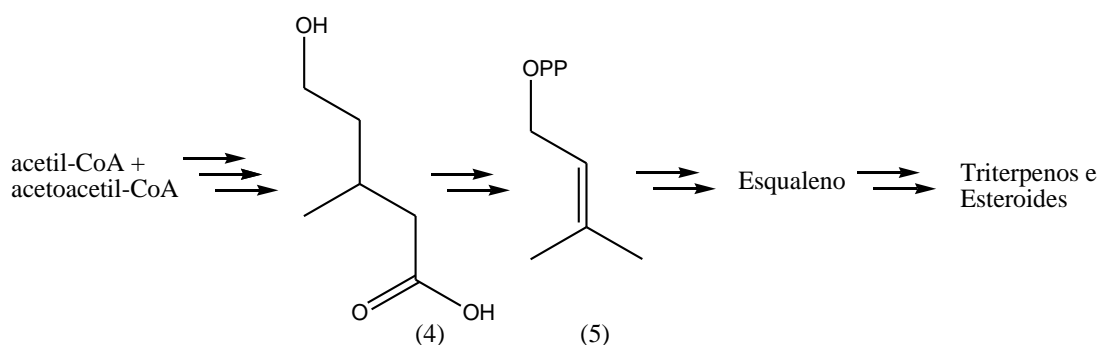


FIGURA 5: ROTA METABOLICA RESUMIDA PARA A FORMAÇÃO DE FITOESTEROIDES.
FONTE: O autor (2014).

Estes compostos vêm sendo intensamente investigados por suas propriedades farmacológicas. A capacidade de inibir a biossíntese de outros esteroides como o colesterol foi relatada por diversos grupos de pesquisa e o seu interesse recai sobre a sua propriedade hipocolesterolêmica (GREBBÉ *et al.*, 2003).

Em 2009 Bartnikowska sistematizou vários estudos sobre o potencial biológico destes compostos. Esta revisão apresentou os resultados de diversos estudos que apontam para o potencial de induzir apoptose em células da próstata, da mama e do cólon, por β -sitosterol (2). O potencial anti-inflamatório também foi reportado para esta classe de metabólitos e foi associado à inibição de secreção de mediadores inflamatórios tais como IL-6 e TNF α (BOUIC, 2001).

Também foi relatado o potencial desta classe de moléculas em atuar no estresse oxidativo. Os trabalhos de Wang, Hicks e Moreau (2002) relatam que fitoesteroides tem a capacidade de inibir *in vitro* a peroxidação lipídica e também reduzir átomos de ferro.

3.3.2. Considerações Sobre a Biossíntese e Propriedades Biológicas de Cumarinas

Segundo Bourgaud *et al.* (2006) cumarinas são encontradas em plantas superiores e são originadas do metabolismo dos fenilpropanoides. Estes fenilpropanoides são derivados da fenilalanina e estão presentes na maior parte nas angiospermas, sendo suas estruturas simples as mais relatadas.

As famílias com mais relatos da presença de cumarinas são: Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymelaceae. A presença desta classe de substâncias já foi relatada em todos os tecidos do vegetal e geralmente estão presentes como misturas complexas.

Sua biossíntese ocorre em resposta a estresse fisiológico, deficiência nutricional, devido a mensageiros químicos como os hormônios vegetais ativados por lesões mecânicas, ataque de insetos, de fungos, resposta ao estresse oxidativo, e mais provavelmente como reguladores hormonais.

De acordo com os trabalhos de Bourgaud *et al.* (2006) a rota biossintética para a formação de cumarinas envolve a *o*-hidroxilação do ácido cinâmico (7) para produzir o ácido *o*-cumárico (8) que posteriormente é ciclizado gerando a cumarina mais simples (6) representada na (Figura 6).

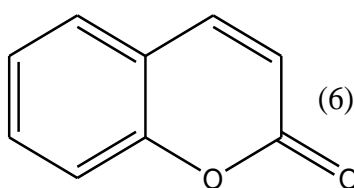


FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DE 1,2-BENZOPIRONA.
NOTA: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA MAIS SIMPLES.
FONTE: O autor (2014).

De outra maneira, os vegetais apresentam arcabouço enzimático para a *p*-hidroxilação do ácido cinâmico (7) que leva à formação do ácido *p*-cumárico (9). Este ácido é então utilizado como substrato para a formação de diferentes cumarinas como representado na (FIGURA 7).

Bourgaud *et al.* (2006) citam que esta classe de metabólitos pode ser subclassificada em cumarinas simples (benzo-a-pironas ou 1,2-benzopironas), e cumarinas oxigenadas na posição 7 (como as furanocumarinas e piranocumarinas) e ainda fenilcumarinas.

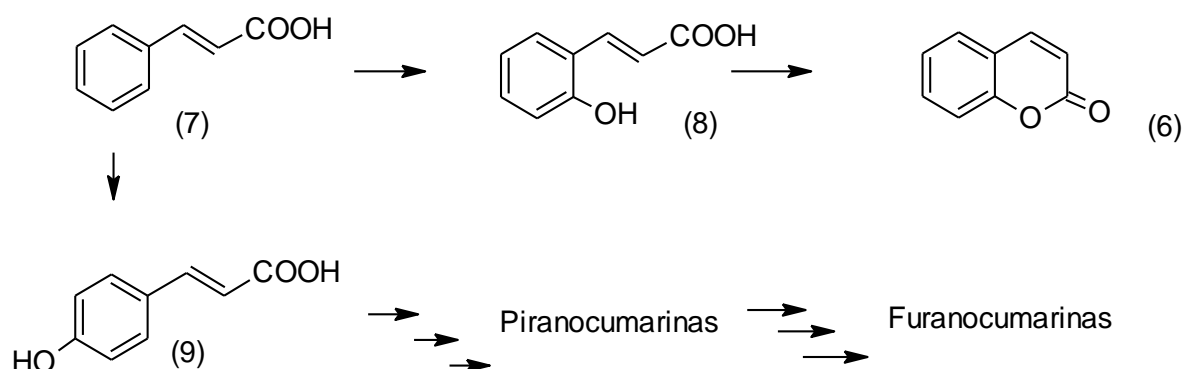


FIGURA 7: ROTA BIOSSINTÉTICA RESUMIDA PARA A FORMAÇÃO DE CUMARINAS.
FONTE: O autor (2014).

Ainda citam que as classes cumarinas simples, furanocumarinas e piranocumarinas derivam da mesma rota metabólica, enquanto fenilcumarinas tem sua biossíntese através do metabolismo de isoflavonas.

3.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE OXIDAÇÕES BIOLÓGICAS E O POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Segundo Alves *et al.* (2010) o termo oxidação para uma substância era definido como a incorporação de oxigênio em sua estrutura química. Atualmente pode ser melhor definido como a reação química que converte uma substância em outra de menor número de elétrons.

O envelhecimento biológico do ser humano é um fenômeno que está associado às mudanças na atividade das células, tecidos e órgãos, como também a uma redução da eficácia de um conjunto de processos fisiológicos, dentre os quais as oxidações biológicas (SORG, 2004).

Os danos causados pelo estresse oxidativo nos seres vivos são cada vez mais estudados ao longo dos anos, bem como os mecanismos fisiológicos de defesa. Já se conhece por exemplo, o papel importante que é desempenhado por enzimas, como a superóxido dismutase juntamente com a catalase e a glutathione peroxidase, que tem como função primordial a detoxificação do organismo no tocante aos peróxidos, peróxidos de hidrogênio e os hidroperóxidos lipofílicos respectivamente (WEYDERT E CULLEN, 2010).

Muitas substâncias originárias da alimentação também desempenham um papel fundamental na proteção dos organismos com relação ao estresse oxidativo. Pode-se destacar os antioxidantes naturais como o ácido ascórbico, o α -tocoferol, além de flavonoides e carotenoides que, valendo-se de um mecanismo não enzimático de captura, protegem a integridade celular (WICKENS, 2001; YAMAMOTO, 2001).

Com relação aos aspectos que envolvem a produção endógena de oxidantes, tanto as causas como os mecanismos moleculares envolvidos ainda não são suficientemente conhecidos. O que se verifica são hipóteses sobre a influência do processo oxidativo no envelhecimento celular. Já se conhece por exemplo, que o papel que o álcool apresenta nos processos de estresse oxidativo está relacionado à toxicidade hepato-renal, pelo decréscimo da concentração de substâncias antioxidantes, aumento da peroxidação lipídica e dano celular (PANDANABOINA *et al.*, 2012).

Paralelamente, o consumo de frutas e vegetais foi associado a uma redução do risco de doenças coronarianas como aterosclerose. Esta atividade benéfica vem sendo atribuída ao teor de polifenóis, substâncias declaradamente antioxidantes, uma vez que estes têm a capacidade de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (CHANG *et al.*, 2000).

Ao longo da última década vários metabólitos secundários, de várias classes diferentes foram isolados e ensaiados com relação as suas propriedades antioxidantes. Estas substâncias têm apresentado resultados significativos e constituem-se como uma possibilidade para reduzir os danos celulares causados pelo estresse oxidativo. Como exemplo podemos destacar os taninos, as cumarinas, as antraquinonas, os fitoesteróis, além de uma ampla gama de referências salientando a utilização de flavonoides.

Dentre os métodos empregados para a avaliação do potencial antioxidante de substâncias existentes na literatura, destaca-se o modelo de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) que se baseia na medida da capacidade de uma substância em sequestrar o radical DPPH (FIGURA 8), reduzindo-o a hidrazina (11). Quando uma substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH (10), a hidrazina (11) é obtida com mudança simultânea na coloração do meio de violeta à amarelo pálido (ALVES *et al.*, 2010).

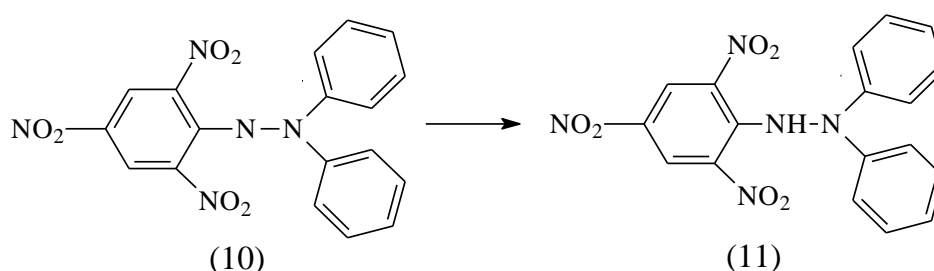


FIGURA 8: MECANISMO DE CAPTURA DE RADICAIS LIVRES PELO DPPH.
 FONTE: Adaptado pelo autor (2014).

Outro método de avaliação da atividade antioxidante de uma substância é o desenvolvido por Pietro, Pineda e Aguilar (1999) que se baseia na medida do poder redutor das substâncias avaliadas pela sua capacidade de reduzir o complexo fosfomolibdênio. Trata-se de uma metodologia de baixo custo, que tem como potencialidade a correlação entre o poder redutor e a atividade antioxidante, tanto em substâncias hidrofílicas como lipofílicas, porém sua utilização é limitada na pesquisa da atividade antioxidante de matrizes ácido-lábeis.

Uma terceira metodologia que traz informações muito importantes para a determinação da atividade antioxidante de substâncias é a determinação da velocidade de peroxidação lipídica, na presença ou ausência de substâncias antioxidantes (MORAIS *et al.*, 2006). Esta determinação baseia-se na reação do ácido tiobarbitúrico (12) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (13) que quando reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (12) forma uma substância (14) de coloração rosa (FIGURA 9) e absorve na região de radiação visível a 535nm. Esta

reação ocorre em meio ácido e altas temperaturas e é utilizada para a quantificação do índice de peroxidação lipídica (VASCONCELOS *et al.*, 2007)

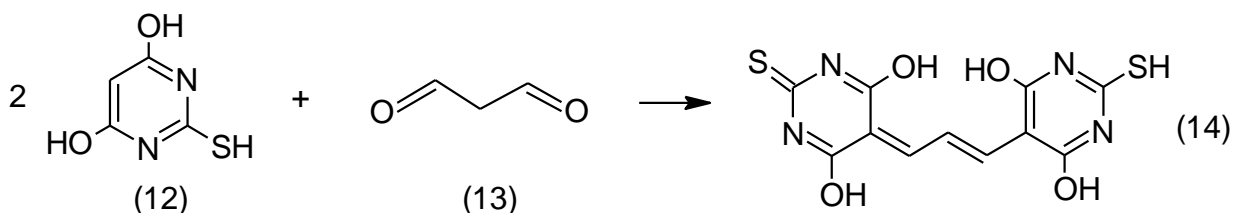


FIGURA 9: REAÇÃO QUÍMICA ENTRE O MALONALDEÍDO E O ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.
FONTE: Adaptado pelo autor (2014).

Levando-se em consideração que os compartimentos biológicos têm características bastante lipofílicas justifica-se a avaliação da peroxidação lipídica, e que quando aplicada a matrizes biológicas como ovos e sangue, mostra uma perspectiva fidedigna à realidade dos organismos (BADARINATH *et al.*, 2010).

3.5. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

O processo inflamatório é caracterizado por reações celulares contra um agente invasor e apresenta o extravasamento de líquidos intracelulares ao interstício. Os sinais físicos mais marcantes deste processo são a ruborização do local, seguido de aquecimento e a formação de edema, tratando-se de um processo doloroso, que remete à perda da função do tecido afetado (DASSOLER *et al.*, 2004).

De acordo com Falcão *et al.* (2005) existem muitas causas relatadas para o processo inflamatório, mas com o mecanismo comum a todos. Os agentes inflamatórios induzem a ativação da enzima fosfolipase A₂ nas membranas celulares, com consequente liberação de ácido araquidônico. Este ácido araquidônico formado pode seguir duas vias diferentes. Quando utilizado como substrato para a via das ciclooxigenases (COX) tem-se a produção de prostaglandinas e quando utilizado

como substrato para a lipooxigenase (LOX) há a produção de leucotrienos e tromboxanos conforme a (FIGURA 10).

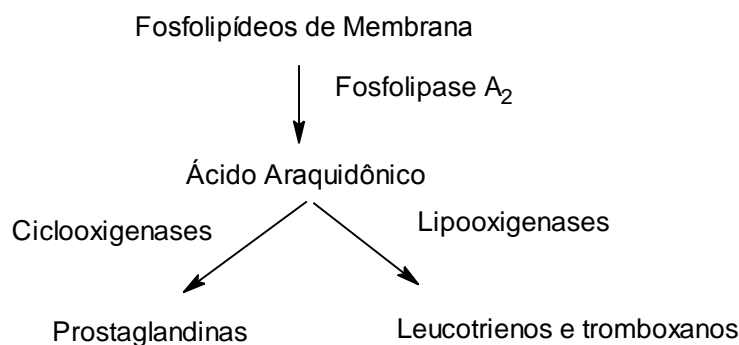


FIGURA 10: REAÇÕES BIOQUÍMICAS QUE LEVAM À FORMAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.

FONTE: Adaptado pelo autor (2014).

Os mediadores inflamatórios como citocinas, histamina, serotonina, leucotrienos e prostaglandinas aumentam a permeabilidade celular para todos os leucócitos que agem no local do tecido inflamado. Qualquer interrupção destes eventos resulta em diminuição significativa da liberação de mediadores inflamatórios, provocando a volta ao estado hemodinâmico normal (LOPE *et al.*, 1987).

Em seus trabalhos de revisão Reuter *et al.* (2010) reuniram estudos de duas décadas que fazem a inter-relação entre o estresse oxidativo, o processo inflamatório e o câncer. Este estudo revelou o mecanismo pelo qual o estresse oxidativo pode levar a inflamação crônica, que por sua vez poderia mediar a maioria das doenças crônicas incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, neurológicas e doenças pulmonares.

O estresse oxidativo pode ativar uma variedade de fatores de transcrição incluindo NF- κ B, AP-1, p53, HIF-1 α , PPAR- γ , β -catenina/Wnt e Nrf2. A ativação desses fatores pode levar à expressão de mais de 500 genes diferentes, incluindo os dos fatores de crescimento e citocinas inflamatórias.

O papel dos produtos naturais no tratamento do processo inflamatório já é reconhecido há bastante tempo. Há um considerável interesse público e científico na utilização de plantas medicinais como agentes terapêuticos. Mesmo com o progresso científico e tecnológico em química combinatória, fármacos derivados de produtos

naturais ainda apresentam grande contribuição na descoberta de novos fármacos (YUAN *et al.*, 2006).

Ainda de acordo com Yuan *et al.* (2006) plantas contendo salicilatos foram e ainda são utilizadas na terapêutica como agentes anti-inflamatórios. O ácido salicílico extraído da espécie *Salix alba* serviu de protótipo para o delineamento da molécula do ácido acetil salicílico no começo do século passado, sendo a substância ativa de um dos anti-inflamatórios mais utilizados no mundo a ASPIRINA®.

Os anti-inflamatórios são classicamente separados em anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que tem como mecanismo principal a inibição das enzimas ciclooxigenases (COX₁ e COX₂) e os anti-inflamatórios esteroidais que tem como mecanismo de ação a inibição da enzima fosfolipase A₂.

Os AINES estão entre os medicamentos mais utilizados no tratamento dos sintomas inflamatórios, entretanto devido aos efeitos colaterais desagradáveis que possuem na sua utilização prolongada e na ineficiência em alguns casos, o controle da dor inflamatória ainda é um grande desafio (BALAJI *et al.*, 2012). Já os anti-inflamatórios esteroidais apresentam efeitos colaterais ainda mais preocupantes, que faz que sua utilização seja ainda mais restrita.

Muitas classes de metabólitos secundários biossintetizados por plantas apresentam atividade anti-inflamatória. Algumas classes com este potencial são os fitoesteróis, as cumarinas, os flavonoides, as cianidinas e alguns alcaloides. Cabe ressaltar que algumas espécies do gênero *Bauhinia* foram avaliadas com relação as suas propriedades anti-inflamatórias e apresentaram resultados bastante promissores.

Segundo Gantait, Das e Pal (2013), o extrato etanólico dos troncos de *Bauhinia acumniata* apresentou atividade anti-inflamatória *in vitro* sobre os modelos da desnaturação da albumina, o teste de estabilização da membrana e o teste de avaliação da inibição de enzimas proteinases.

Outras espécies também foram avaliadas e de acordo com os trabalhos de Balaji *et al.* (2012) o extrato etanólico dos troncos de *Bauhinia purpurea* foi submetido aos ensaios sobre o edema de pata induzido por carragenina. Os autores relataram que neste modelo o extrato etanólico de *Bauhinia purpurea* apresentou atividade e pode ter efeito inibitório sobre a rota de biossíntese de prostaglandinas, ou pode agir como inibidor da liberação de histamina e serotonina.

Em estudos recentes de Das, Jagannath e Dinda (2012) o extrato etanólico dos troncos de *Bauhinia vahlii* foi avaliado frente a testes de conteúdo químico, seu potencial anti-inflamatório e seu potencial sobre o diabetes. A avaliação fitoquímica preliminar revelou a presença de alcaloides, flavonoides e fitoesteroides. Os autores relatam que com doses de 353mg/kg para os animais, obtiveram diminuições significativas do edema de pata provocado por indução pela carragenina.

Ainda, o trabalho de Apisantiyakoma *et al.* (2004) apresentou o isolamento e a avaliação do potencial citotóxico e de inibição das enzimas COX₁ e COX₂, de uma série de novos compostos do tipo bibenzil, isolados a partir das raízes de *Bauhinia saccocalyx*. Estes pesquisadores descreveram que o novo composto bauhinol D foi ativo na inibição de ambas as enzimas COX, com IC₅₀% comparável ao do ácido acetilsalicílico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material Vegetal

O material vegetal *Bauhinia glabra* Jacq., Fabaceae foi coletado na cidade de Rondonópolis, no estado do Mato Grosso – Brasil. Trata-se dos troncos que após processo de secagem foram fracionados em porções menores e processados em moinho de facas e martelos.

Tal material teve sua identidade atestada por comparação com exsicata incorporada no museu botânico de Curitiba sob o número 287876, e também por comparação com a fotografia de exsicata depositada no *Missouri Botanical Garden* conforme a (FIGURA 11). Cabe salientar que a coleta deste material está em acordo com os aspectos legais conforme certificado do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGEM (ANEXO 1)



FIGURA 11: FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE
FONTE: MISSOURI BOTANICAL GARDEN.

4.1.2. Reagentes e Solventes Utilizados

Todos os reagentes e solvente utilizados foram de pureza analítica e de procedência Merck, Aldrich Chemical Company e Vetec.

Foram utilizados reagentes e solventes comerciais sem prévia purificação e para as separações cromatográficas foi utilizada sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) além de reagentes comuns aos laboratórios de fitoquímica.

4.1.3. Equipamentos

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C foram executadas em equipamento Bruker 200MHz pertencente ao departamento de química da Universidade Federal do Paraná. Os solventes utilizados foram MeOD e CDCl₃, contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

As análises de massas foram realizadas em um equipamento triplo quadrupolo de marca Applied Biosystems e modelo API 3200, equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus e fonte de ionização do tipo eletrospray (ESI).

As amostras foram infundidas no equipamento através de cromatógrafo a líquido Agilent 1100 com bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1379A e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager.

4.2. MÉTODOS

O presente trabalho descreve alguns aspectos do perfil fitoquímico do extrato bruto hidroalcoólico e frações, obtidas através de processo de extração a partir dos troncos de *B. glabra*, bem como o estudo do potencial antioxidante e toxicológico preliminar para o extrato bruto (EB) e suas frações, e anti-inflamatório/antinociceptivo para o (EB) conforme representação esquemática da (FIGURA 12).



FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DESTE TRABALHO.

FONTE: O autor (2014).

Conforme se pode observar na (FIGURA 12) este trabalho envolveu a obtenção do extrato bruto em aparato de Soxhlet, com sequencial partição deste extrato com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila) em aparelho de Soxhlet modificado.

Envolveu também a caracterização química do extrato bruto com relação aos aspectos como rendimento de extração e rendimento de particionamento, e ainda a detecção e quantificação dos principais grupos de metabólitos primários e secundários, além do isolamento e identificação de possíveis marcadores.

O potencial antioxidante do extrato bruto e frações de *B. glabra* foi avaliado por quatro métodos *in vitro*, pela capacidade de captura de elétrons pelo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder redutor apresentado frente ao fosfomolibdênio complexo, pela avaliação da inibição do índice de peroxidação lipídica pelo método de detecção das espécies reativas frente ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e a avaliação da capacidade que as amostras apresentarem em recuperar o conteúdo de meta hemoglobina em suspensão de eritrócitos.

A toxicidade foi avaliada apenas de modo preliminar *in vitro* pela avaliação da letalidade causada pelo extrato bruto e frações de *B. glabra* ao microcrustáceo *Artemia salina* e pela avaliação de seu potencial hemolítico em suspensão de eritrócitos.

A atividade anti-inflamatória/ antinociceptiva foi avaliada somente para o extrato bruto de *B. glabra* pelos métodos clássicos: Nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina; Potencial antiedematogênico em modelo induzido por carragenina e; Nocicepção térmica em placa quente. O comprometimento motor dos animais foi avaliado pelo método do campo aberto. Os detalhes experimentais são apresentados nas seções subsequentes.

4.2.1. Protocolo para a Obtenção do Extrato Bruto e Frações dos troncos de *Bauhinia glabra* Jacq., Fabaceae

O material vegetal (2 kg de troncos) foi seco em estufa, triturado em moinho de facas e martelos e então submetido à extração continuada em aparelho de Soxhlet com etanol 95% a 78°C durante 24 horas conforme (FIGURA 13), e então filtrado. A solução foi concentrada sob pressão reduzida até 300mL para produzir o extrato bruto, que foi codificado como (EB).



FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO DO APARATO PARA EXTRAÇÃO EM SOXHLET.
FONTE: Adaptado de imagem de internet.

O (EB) em seguida foi particionado (líquido-líquido) em aparelho Soxhlet modificado com solventes em ordem crescente de polaridade por 48 horas cada processo de partição. Este processo gerou 4 frações: Hexano (codificada como FH); Clorofórmio (codificada como FC); Acetato de etila (codificada como FA); e o remanescente (codificada como FR). As massas do (EB) e das frações foram medidas e os valores foram utilizados para os cálculos de rendimento.

Um sólido amorfo escuro precipitou ao longo do particionamento com acetato de etila. A solubilidade deste sólido foi avaliada e este apresentou-se solúvel em metanol. Este sólido foi separado e codificado como (FM).

O (EB) obtido e as frações (FH, FC, FA, FM e FR) foram utilizados como amostras para a detecção e quantificação dos principais grupos de metabólitos e para a realização dos testes de potencial antioxidante e toxicidade preliminar. O (EB) foi utilizado para a avaliação das atividades anti-inflamatória/antinociceptiva. Estas amostras serviram também como matriz para a detecção, quantificação, isolamento e identificação dos constituintes.

4.2.2. Protocolos em Análise Fitoquímica

4.2.2.1. Detecção dos Principais grupos de Metabólitos Secundários

Para a análise dos principais grupos de metabólitos secundários foi empregada a metodologia proposta por Moreira (1979) com modificações. As classes de metabólitos pesquisadas foram alcaloides, flavonoides, taninos, cianidinas, triterpenos, esteroides, cumarinas, antraquinonas e saponinas. Foram preparadas soluções do (EB) e frações em metanol, na concentração de 10mg/mL do (EB) e frações, que foram ensaiadas conforme protocolos detalhados disponíveis no (ANEXO 2) deste trabalho.

4.2.2.2. Quantificação do Conteúdo Total de Clorofilas A e B, e Carotenoides

A fim de determinar o teor de clorofila total (TChlC), que é a soma aritmética dos teores de clorofila A (TChlCa) e de clorofila B (TChlCb), e o teor total de carotenoides (TCarC), as amostras foram preparadas em soluções em metanol, na concentração de 1000µg/mL do (EB) e das frações. Este ensaio foi realizado conforme descrito por Dere, Gunes e Sivaci (1998).

As absorbâncias de todas as soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 666, 653 e 470nm, e os conteúdos totais dos metabólitos foram calculados conforme as equações (1), (2) e (3) como segue, expressos em mg/g.

$$\text{TChlCa} = (15.65 \times A_{666}) - (7.340 \times A_{653}) \quad \text{Equação (1)}$$

$$\text{TChlCb} = (27,05 \times A_{653}) - (11,21 \times A_{666}) \quad \text{Equação (2)}$$

$$\text{TCarC} = (1000 \times A_{470}) - (2,860 \times \text{TChlCa}) - \left(129,2 \times \left[\frac{\text{TChlCb}}{245} \right] \right)$$

Equação (3)

4.2.2.3. Quantificação do Conteúdo Total de Fenólicos

O conteúdo total marcado em fenólicos (TPheC) foi determinado para o (EB) e as frações empregando-se a técnica descrita por Folin e Dennis (1915), adaptada por Singleton e Rossi (1965).

Uma amostra de 100µg do (EB) e das frações, ou uma série de soluções padrão de ácido gálico (0, 10, 20, 30, 40 e 50 ppm) foram diluídas em um volume de 7,5mL de água desionizada e 0,2mL do reagente Folin-Ciocalteu® (Sigma). A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos e então foram adicionados 0,4mL de carbonato de sódio 10%.

Após este procedimento, as amostras foram aquecidas a uma temperatura de 40°C em banho-maria por 20 minutos, e em seguida imediatamente resfriadas por imersão em banho de gelo. As absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 760nm. Os resultados foram obtidos por regressão linear em termos da curva de calibração obtida para as soluções de ácido gálico e expressos em mg/g.

4.2.2.4. Quantificação do Conteúdo Total de Fitoesteroides

A determinação do conteúdo total de fitoesteroides (TPhyC) foi realizada pela construção de curva de calibração para estigmasterol, com as concentrações variando entre 7,5 à 12,5 mg/mL em clorofórmio. Então 2mL do reagente de Lieberman-Burchardt foram adicionados aos padrões com exceção do branco, e o volume final das soluções foi diluído para 9mL com clorofórmio.

As amostras, (EB) e frações, foram preparadas para atingir a concentração de 10mg/mL, e então foram submetidas ao mesmo tratamento que os padrões. As amostras permaneceram em temperatura ambiente e protegidas da luz por 15 minutos e após este período foram realizadas as determinações de absorbância em espectrofotômetro a 640nm (DAKSHA *et al*, 2010).

4.2.2.5. Quantificação do Conteúdo Total de Flavonoides

A quantificação de flavonoides foi realizada pelo método do tricloreto de alumínio utilizando-se catequina como o composto de referência (CHANG *et al.*, 2002). Foram preparadas as amostras em solução na concentração de 100mg/mL em metanol.

A curva de calibração foi preparada para a catequina em soluções com diferentes concentrações de 5mg/mL a 25mg/mL em metanol. Sobre 200µL destas soluções preparadas foram adicionados 100µL de uma solução de cloreto de alumínio

10%, 100µL de acetato de potássio 1M e 2,6mL de água destilada. A determinação das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 415nm.

4.2.2.6. Quantificação do Conteúdo Total de Antocianidinas

O teor de antocianinas totais (TAnthC) foi determinado conforme Ribéreu-Gayon *et al.* (2006), utilizando-se duas amostras do (EB) e frações na concentração de 0,5mg/mL em etanol. A cada amostra foram adicionados os volumes de 0,5mL de HCl 0,1% em etanol e 10mL de HCl 2% aquoso.

A primeira amostra foi diluída com 4mL de água destilada e a segunda foi tratada com 4mL de bissulfito de sódio 13% aquoso.

As amostras foram então diluídas ao dobro de seu volume pela adição de etanol, e as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 520nm. A amostra não tratada com o bissulfito de sódio foi utilizada como branco de leitura. Os valores de absorbâncias obtidos foram multiplicados pelo fator 875, fornecendo os teores de antocianidinas totais, que foram expressos em mg/g.

4.2.2.7. Quantificação do Conteúdo Total de Taninos

Para se determinar o conteúdo total de taninos foram preparados dois tubos-teste (1 e 2) para cada amostra na concentração de 0,5mg/mL em etanol. A estas soluções foram adicionados 3mL de HCl concentrado e 1mL de água destilada (RIBÉREU-GAYON *et al.*, 2006).

O tubo-teste 1 de cada amostra foi incubado em banho-maria à 100°C por 30 minutos, e o tubo-teste 2 foi diluído pela adição de 0,5mL de etanol. As absorbâncias (ΔOD) dos tubos-teste foram determinadas em espectrofotômetro a 470, 520 e 570nm, utilizando-se o tubo-teste 2 de cada amostra como branco. As equações (4) e (5) foram utilizadas para o cálculo de novos dois valores de (ΔOD 520).

$$\Delta OD\ 520 = 1,10 \Delta OD\ 470 \quad \text{Equação (4)}$$

$$\Delta OD\ 520 = 1,54 \Delta OD\ 570 \quad \text{Equação (5)}$$

O teor de taninos totais foi calculado pela equação (6) empregando-se o menor valor de ($\Delta OD\ 520$), determinado experimentalmente ou calculado, e foi expresso em mg/g.

$$TTanC = 15,7 \Delta OD\ 520 \quad \text{Equação (6)}$$

4.2.2.8. Protocolos para o Isolamento e Identificação dos Fitoconstituintes

Para o isolamento dos compostos químicos constituintes da espécie em estudo foram empregadas as técnicas clássicas de separação. Os procedimentos de cromatografia em coluna foram realizados em coluna sobre sílica gel 60 Merk® (0,063 – 0,200mm) com eluição em sistema gradiente.

O sistema eluente empregado para a purificação da fração menos polar (FH) envolveu misturas dos solventes hexano:acetato de etila em porções de 100mL e com incrementos de 5% (v/v) de acetato de etila a cada porção.

A fração de media/baixa polaridade (FC) foi submetida a cromatografia utilizando-se o mesmo sistema eluente utilizado para a (FH). Porém ao se estabelecer a condição de acetato de etila 100%, começaram-se incrementos de 5% (v/v) com metanol.

Para a separação cromatográfica dos compostos das (FA), (FM) e (FR) utilizou-se como eluente um sistema em gradiente envolvendo a utilização de acetato de etila:metanol também em porções de 100mL e também com incrementos de 5% (v/v) do eluente de maior polaridade.

A pureza dos compostos separados foi determinada com o auxílio de técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se placas cromatográficas da Merk®. Para a revelação dos compostos submetidos a (CCD) foram utilizados os reveladores clássicos em fitoquímica como iodo, vanilina sulfúrica, e também a

avaliação das placas sob radiação na região do ultravioleta (UV), de ondas longas e curtas. A elucidação estrutural dos compostos isolados foi realizada através de técnicas espectrométricas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas.

4.2.3. Protocolos para a Avaliação do Potencial Biológico *in vitro*

Os ensaios de potencial biológico *in vitro* são descritos como métodos adequados para a avaliação preliminar de atividade biológica. Tratam-se de métodos clássicos de baixo custo, e que racionalizam a pesquisa de novas substâncias com interesse terapêutico. Os métodos propostos para este trabalho estão apresentados a seguir.

4.2.3.1. Avaliação do Potencial Antioxidante pela Captura de Hidrogênio pelo Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livre e estável com o qual compostos vegetais que apresentam potencial antioxidante interagem. Este radical captura um átomo de hidrogênio de substâncias com potencial antioxidante. Este parâmetro foi determinado através de determinações espectroscópicas segundo Mensor *et al.* (2001). As amostras foram preparadas em solução em metanol nas concentrações de 2,0 à 12,5 $\mu\text{g/mL}$. À 2,5mL destas soluções preparadas foi adicionado 1mL de uma solução de DPPH em metanol, na concentração de 0,03mmol/mL. Para a (FH) foram utilizadas cinco soluções com concentrações entre 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$.

Para cada amostra foi preparado um tubo em branco contendo 2,5mL das soluções do (EB) e frações e 1mL de metanol. Paralelamente foi preparado um controle negativo pela adição de 2,5mL de metanol em 1mL de solução de DPPH.

Após trinta minutos de reação foram realizadas as determinações das absorbâncias em espectrofotômetro a 518nm. Os dados de absorbância foram tratados conforme a equação (7) e submetidos à regressão linear para o cálculo do índice de captura de 50% das moléculas do DPPH em solução (IC_{50%}). Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico, submetido ao mesmo tratamento.

$$\% \text{ Captura DPPH} = 100 - \left(\frac{\text{Abs amostra} - \text{ABS branco}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100$$

Equação (7)

4.2.3.2. Avaliação do Poder Redutor Frente ao Complexo do Fosfomolibdênio

Este método foi executado com base em Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Uma solução na concentração de 200µg/mL foi preparada em metanol para o (EB) e frações. Sobre alíquotas de 300µL das soluções preparadas anteriormente foram adicionados 3 mL do reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após resfriamento as absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 695nm.

Como branco de análise foram utilizadas soluções contendo 300µL de metanol adicionados a 3mL do reagente do complexo do fosfomolibdênio. O poder redutor das amostras foi comparado com o padrão ácido ascórbico (200µg/mL) que teve o seu poder redutor normalizado para 100% (BALESTRIN *et al.*, 2008).

4.2.3.3. Avaliação do Índice de Inibição da Peroxidação Lipídica pelo Método do TBARS

Este ensaio foi realizado segundo Moraes *et al.* (2006) com modificações. As amostras e o controle positivo butil-hidroxi-tolueno (BHT) foram preparados na concentração de 500ppm em metanol. A estas soluções foram adicionados 0,4mL de

água, 0,5mL de uma solução de gema de ovo a 10% (m/v) em água, 50µL de ABAP 0,07M (cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), 1,5mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,8% (TBA) em SDS 1,1% (dodecil sulfato de sódio).

As amostras preparadas foram levadas ao banho-maria a 95°C por 1 hora e após resfriamento foram tratadas com 5,0mL de 1-butanol. Estas amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e em seguida as absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas em espectrofotômetro a 532nm.

Como branco de análise foram utilizados 5mL de 1-butanol. O controle negativo emprega todos os reagentes, sem as amostras. A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%IPL) foi calculada conforme a equação (8).

$$\%IPL = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs amostras}}{\text{Abs controle negativo}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

4.2.3.4. Avaliação da Recuperação do Conteúdo de Meta Hemoglobina em Eritrócitos

As amostras foram submetidas a esse teste que é baseado em Naoum, Radispiel e Moraes (2004) e Furmam *et al.* (2012) com modificações.

Uma suspensão de eritrócitos a 10% foi preparada em solução tampão fosfato (pH 7,4) utilizando-se sangue de carneiro comercial (Newprov®).

As amostras testadas foram diluídas em dimetil-sulfóxido (DMSO) 1% e NaCl 0,9% e testadas na concentração de 1000µg/mL. Então, 200 µL da suspensão de eritrócitos foram adicionados cuidadosamente à 500µL das soluções das amostras e essa mistura foi homogeneizada lentamente, e deixadas em repouso por 3 horas a 37°C.

Posteriormente as amostras foram completamente hemolisadas pela adição de 100µL de uma solução de saponina 1%. A mistura dos reagentes e solventes, sem as amostras, foi utilizada como controle negativo. O resultado foi apresentado como a porcentagem de meta hemoglobina determinada nas soluções, baseada na soma das

absorbâncias determinadas em espectrofotômetro a 540nm e 630nm após hemólise conforme equação (9).

$$\% \text{Meta hemoglobina} = \left(\frac{\text{Abs } 630 \times 100}{\text{Abs } 540 + \text{Abs } 630} \right) \quad \text{Equação (9)}$$

4.2.3.5. Avaliação do Potencial de Letalidade a *Artemia salina*

Para a realização deste ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Meyer *et al.*, (1982) com modificações. Os ovos de *Artemia salina* foram adicionados a uma solução salina 3,5% para atingir a concentração de 0,5g/mL. A eclosão dos náupilos foi realizada com iluminação artificial, aeração constante da solução e pH mantido em 9 por 48 horas. As amostras foram testadas nas concentrações de 1000µg/mL, 100µg/mL e 10µg/mL.

Após a eclosão, 30 indivíduos foram submetidos durante 24 horas frente a cada concentração, e então foram contabilizados os indivíduos mortos. Soluções de sulfato de quinidina nas mesmas concentrações foram utilizadas como controle positivo e metanol como controle negativo. Os dados foram analisados por regressão linear e expressos como a dose letal para 50% dos indivíduos (DL_{50%}). As amostras foram consideradas como possuindo potencial de causar letalidade quando a DL_{50%} se apresentou menor que 1000µg/mL.

4.2.3.6. Avaliação do Potencial Hemolítico

A avaliação do potencial hemolítico foi realizada conforme a metodologia descrita por (WHO, 1998) com adaptações. Para o preparo da suspensão de eritrócitos foram utilizados 15mL de sangue de carneiro comercial (NEWPROV®) que foram centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos.

O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos lavados com solução tampão fosfato (pH 7,4) por 3 vezes. As células foram ressuspedidas em solução tampão fosfato (pH 7,4) para alcançar a concentração de 15%.

As amostras foram testadas em solução a 500µg/mL em dimetil-sulfóxido (DMSO) 1% e NaCl 0,9%. Então foram incubadas em estufa a 37°C por 3 horas e as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 540nm.

Como controle positivo foi utilizada uma solução de saponina 1% e como controle negativo foi utilizado um tubo-teste sem tratamento. O resultado foi expresso em porcentagem de hemólise baseado em 100% de hemólise normalizado para o controle positivo.

4.2.4. Protocolos para Avaliação do Potencial Anti-inflamatório e Antinociceptivo *in vivo*

A avaliação do potencial anti-inflamatório/antinociceptivo foi realizada para o (EB) dos troncos de *B. glabra* pelos métodos da formalina, da placa quente e do edema induzido por carragenina. A avaliação do comprometimento motor foi realizada pelo método do campo aberto, conforme protocolos a seguir.

4.2.4.1. Aspectos Éticos

Este trabalho foi submetido à análise por Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, obtendo aprovação conforme certificado no (ANEXO 3), sob o número 762.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.2.4.2. Animais

Para os ensaios da formalina, placa quente, campo aberto e carragenina foram utilizados ratos Wistar (180-220g), todos provenientes do biotério central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram ambientados em grupos de 5 animais em caixas de propileno e mantidos em temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo de 12h claro e 12h escuro e com água e ração à vontade.

4.2.4.3. Amostras Ensaçadas

Os ratos foram tratados com soluções aquosas (Tween 80; 1%) preparadas para o (EB) nas concentrações de 1mg/100 μL , 3mg/100 μL e 9mg/100 μL . As doses testadas foram de 1mg/kg, 3 mg/kg e 9mg/kg, equivalentes ao peso do animal. A via de administração foi intraperitoneal, 30 minutos antes da realização de cada teste. O grupo controle recebeu somente veículo 100 μL /kg equivalente ao peso do animal via intraperitoneal, 30 minutos antes de cada teste.

4.2.4.4. Avaliação da Nocicepção Induzida por Injeção Intraplantar de Formalina

Os indivíduos dos grupos foram tratados com as amostras (ou veículo) por injeção intraperitoneal, e 30 minutos depois receberam 100 μL de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar da pata posterior direita (HUNSKAAR E HOLE, 1987, TJOLSEN *et al.*, 1992). Após a injeção de formalina os animais foram observados nos intervalos de 0-15 minutos (fase neurogênica) e de 20-60 minutos (fase inflamatória). Foram contabilizados cumulativamente a cada 5 minutos os movimentos bruscos com a pata que recebeu a solução de formalina.

Ao início de cada dia de experimentos um animal recebeu somente a injeção da solução de formalina para avaliação da resposta dolorosa frente as condições ambientais daquele dia.

4.2.4.5. Avaliação da Capacidade Locomotora: Teste do Campo Aberto (*Open Field*)

O teste de campo aberto foi utilizado para excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva das amostras esteja relacionada com efeitos inespecíficos, tanto a nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais (ARCHER, 1973).

O aparato para a realização deste teste consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, com o assoalho desta arena dividido em 9 quadrantes iguais.

As medições foram realizadas em sala fechada com ausência de som e luzes fortes. Os indivíduos dos grupos receberam os tratamentos (ou o veículo) e foram deixados percorrer o campo livremente enquanto o ensaio foi filmado para posterior análise. O número de cruzamentos entre os quadrantes da arena, com todas as patas (*crossing*), foi contado cumulativamente durante 5 minutos.

4.2.4.6. Avaliação da Nocicepção Térmica Sobre a Placa Quente

O teste da placa quente, proposto inicialmente por Woolfe e Mc Donald (1944), tem como objetivo determinar se há inibição da nocicepção por estímulo térmico causada pelas amostras testadas.

Após a retirada dos indivíduos dos grupos do campo aberto, estes foram submetidos a um estresse térmico sobre uma placa de metal aquecida a $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, dentro de um cilindro acrílico.

O tempo contabilizado em segundos até o animal lambear, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa aquecida foi cronometrado e considerado como

indicador do efeito nociceptivo. O tempo de corte para este ensaio foi de 30 segundos, que foi normalizado como 100% de atividade antinociceptiva.

4.2.4.7. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória pelo Modelo do Edema de Pata Induzido por Carragenina

Este ensaio foi realizado conforme Winter, Risley e Nuss (1962). Os tratamentos (ou o veículo) foram administrados por via intraperitoneal e 30 minutos após esta administração o edema foi induzido pela injeção subcutânea de uma solução de carragenina (300 µg/100µL em tampão PBS) na pata posterior direita (LEVY, 1969). A pata contralateral (pata posterior esquerda) recebeu o mesmo volume de tampão PBS e foi utilizada como controle negativo.

O edema de pata foi avaliado nos intervalos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a indução, utilizando-se um paquímetro digital para as medidas da espessura das patas. O edema de pata foi expresso em espessura (mm), como a diferença entre as medidas da pata direita e esquerda.

4.2.4.8. Grupos Experimentais e Análises Estatísticas

As análises de conteúdo total dos grupos de metabólitos foram realizadas para o (EB) e frações em triplicata, e os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$.

As avaliações do potencial biológico *in vitro* e toxicidade preliminar foram realizadas para o (EB) e frações em triplicata, e os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ sendo as medias comparadas por ANOVA uma via ($p < 0,05$).

As análises de correlação multivariada e dendrogramas de análises de ligação (distâncias Euclidianas) foram executadas entre os resultados obtidos na prospecção fitoquímica e as avaliações de potencial antioxidante, com a utilização do software *STATISTICA 10.0*.

As análises biológicas *in vivo* para a avaliação da atividade anti-inflamatória/Antinociceptiva, e o comprometimento motor foram realizadas para o (EB) em replicatas de no mínimo 5 animais (conforme o erro padrão apresentado) e os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{Erro Padrão da Media}$ (EPM). As medias foram comparadas empregando-se ANOVA de uma via ($p < 0,05$).

Os gráficos para os potenciais biológicos *in vitro* e *in vivo* foram construídos utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism 5.0*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS PARA OS PROTOCOLOS EM ANÁLISE FITOQUÍMICA

5.1.1. Rendimento do Processo de Extração

Após os procedimentos de extração e sequencial particionamento do (EB) dos troncos de *Bauhinia glabra* Jacq. os rendimentos para cada fração foram calculados. Os resultados estão apresentados na (TABELA 3) juntamente com os teores de metabólitos totais determinados para o (EB).

TABELA 3 - RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE E CONTEÚDOS TOTAIS DE METABÓLITOS DETERMINADOS

Rendimento de extração (g \pm D. P.)	
EB	92,85 \pm 1,44
Rendimento (% \pm D. P.)	
FH	21,39 \pm 0,90
FC	20,06 \pm 1,02
FA	5,68 \pm 0,87
FM	40,23 \pm 1,62
FR	12,64 \pm 1,57

NOTA: RESULTADOS EXPRESSOS COMO MEDIA \pm D. P. DE 3 AMOSTRAS DO EXTRATO BRUTO DOS TRONCOS DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE. (EB): EXTRATO BRUTO; (FH): FRAÇÃO HEXANO; (FC): FRAÇÃO CLOROFÓRMIO; (FA): FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; (FM): FRAÇÃO METANOL; (FR): FRAÇÃO REMANESCENTE; (D. P.): DESVIO PADRÃO.

Como se pode perceber pela análise da (TABELA 3) o rendimento absoluto de extração foi de 92,85 \pm 1,44g de (EB). Este valor corresponde a um teor de sólidos de 4,64% extraídos do material vegetal seco. Este extrato se apresentou como um sólido de coloração escura, mas avermelhado quando em solução. Uma amostra de 1g deste material foi separado para ensaios de potencial biológico.

O material bruto foi então particionado em aparato de Soxhlet modificado, e o correspondente a 21,39% do (EB) foi extraído por este processo com o solvente hexano. Normalmente neste primeiro processo de partição pôde-se separar as

clorofilas, os carotenoides, os terpenoides e compostos lipofílicos de baixa massa molecular. Esta fração se apresentou como um sólido de baixo ponto de fusão, de aspecto pegajoso, de coloração esverdeada e foi codificada fração hexano (FH).

Esta fração foi concentrada sob pressão reduzida e separada, e o processo de partição com clorofórmio foi iniciado. Este solvente foi capaz de extrair o total de 20,06% da massa do (EB), contando com a presença das substâncias de media/baixa polaridade. Nesta fração classicamente se encontram ainda alguns pigmentos, terpenoides, cumarinas e em alguns casos agliconas de derivados flavônicos. Ao final desta etapa do processo de particionamento obteve-se um sólido esverdeado de baixo ponto de fusão, que apresentou aspecto de cera, e foi denominado fração clorofórmio (FC).

Novamente o resíduo do (EB) seguiu para a terceira etapa do processo de particionamento, com acetato de etila, extraíndo-se 5,68% em massa. Esta fração, após concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, se apresentou como um sólido vermelho escuro, vítreo, contendo as substâncias de media/alta polaridade. Este sólido foi então nomeado como fração acetato (FA).

Ao longo do processo de particionamento com acetato de etila um sólido escuro e amorfo que desenvolveu coloração vermelha em solução precipitou. Este sólido foi separado por filtração e a porcentagem em massa para esta inesperada fração foi determinada em 40,23%. Este sólido teve sua solubilidade avaliada, e por ser bastante solúvel em metanol foi denominado fração metanol (FM).

O material restante se apresentou como um líquido bastante viscoso, correspondente a 12,64% da massa do (EB) e de coloração violácea. Esta fração foi codificada como fração remanescente (FR).

5.1.2. Resultados Obtidos nas Análises de Detecção dos Principais Grupos de Metabólitos Secundários

O (EB) e frações de *B. glabra* foram avaliados quanto a presença dos principais grupos de metabólitos. Os resultados deste estudo preliminar estão descritos na (TABELA 4).

TABELA 4 - RESULTADOS DAS ANÁLISES FITOQUÍMICAS PRELIMINARES DO EXTRATO BRUTO DOS TRONCOS DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE

Glicosídeos Antociânicos	++
Saponinas	+
Alcaloides	-
Taninos Condensados	+++
Taninos Hidrolisáveis	-
Derivados Flavônicos	+
Cumarinas	++
Triterpenos	-
Fitoesteroides	+++

NOTA: RESULTADOS POSITIVOS: +; ++; +++; RESULTADOS NEGATIVO: -

Conforme a (TABELA 4) percebe-se a presença de flavonoides, cianidinas, taninos condensados, fitoesteroides, cumarinas e saponinas, como componentes do (EB). Os resultados apresentados sugerem que a espécie *B. glabra* possui um metabolismo bastante direcionado para a produção de cumarinas pela via do ácido chiquímico, através da biossíntese de fenilpropanoides.

Também se pode perceber pelo resultado bastante expressivo, que o metabolismo também está direcionado para a produção de fitoesteroides pela via do ácido mevalônico. Ainda nota-se pela alta detecção de taninos condensados, que há uma participação bastante significativa da rota metabólica mista entre o ácido chiquímico e acetil-CoA. Todas as classes de metabólitos secundários detectadas possuem atividade biológica das mais variadas e portanto procedeu-se análise fitoquímica mais detalhada destas amostras.

5.1.3. Resultados Obtidos na Quantificação dos Principais Grupos de Metabólitos

Conforme os métodos apresentados anteriormente para o desenvolvimento deste trabalho, as clorofilas, carotenoides, fitoesteroides, taninos, cianidinas,

flavonoides e fenólicos totais foram quantificados para o (EB) e as frações dos troncos de *B. glabra*. Os resultados destas análises estão na (TABELA 5).

TABELA 5 - CONTEÚDO TOTAL DOS METABÓLITOS PESQUISADOS POR FRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE

	TChlCa mg/g	TChlCb mg/g	TcarC mg/g	TPheC mg/g	TPhyC mg/g	TAnthC mg/g	TTanC mg/g	TFlaC mg/g
FH	0,45±0,03	0,42±0,04	0,29±0,02	n.d.	106,34±0,40	n.d.	n.d.	n.d.
FC	0,64±0,02	0,65±0,03	6,42±0,03	n.d.	68,02±0,50	n.d.	n.d.	n.d.
FA	n.d.	n.d.	n.d.	165,5±0,40	n.d.	n.d.	6,02±0,70	43,00±0,90
FM	n.d.	n.d.	n.d.	79,50±0,40	n.d.	n.d.	6,02±0,80	n.d.
FR	n.d.	n.d.	n.d.	135,38±0,03	n.d.	83,08±0,50	19,65±0,80	n.d.
EB	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,003	1,35 ± 0,03	58,50 ± 1,98	42,21 ± 2,34	10,50 ± 1,26	5,24 ± 1,02	2,83 ± 0,06

NOTA: RESULTADOS EXPRESSOS COMO MEDIA±D. P. DE 3 AMOSTRAS DO EXTRATO BRUTO DOS TRONCOS DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE. (EB): EXTRATO BRUTO; (FH): FRAÇÃO HEXANO; (FC): FRAÇÃO CLOROFÓRMIO; (FA): FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; (FM): FRAÇÃO METANOL; (FR): FRAÇÃO REMANESCENTE; (EB) EXTRATO BRUTO; (TChlCa): CONTEÚDO TOTAL DE CLOROFILA A; (TChlCb): CONTEÚDO TOTAL DE CLOROFILA; (TcarC): CONTEÚDO TOTAL DE CAROTENOIDES; (TPheC): CONTEÚDO TOTAL DE FENÓLICOS; (TPhyC): CONTEÚDO TOTAL DE FITOESTEROIDES; (TAnthC): CONTEÚDO TOTAL DE ANTOCIANIDINAS; (TTanC): CONTEÚDO TOTAL DE TANINOS; (TFlaC); (D. P.): DESVIO PADRÃO; (n. d.): NÃO DETECTADO.

A pesquisa destes grupos de metabólitos foi realizada para o (EB) e nas diferentes frações com o objetivo de correlacionar os teores destes fitoconstituintes com suas potencialidades biológicas e conforme os resultados apresentados na (TABELA 5) percebe-se que como esperado as clorofilas e os carotenoides acumularam-se nas frações menos polares. A (FH) apresentou o teor de 0,87mg/g de clorofila total e 0,29mg/g de carotenoides. Estes pigmentos também foram quantificados na (FC), com o teor de 1,29mg/g de clorofilas totais. Para esta fração pode-se perceber também o acúmulo significativo dos pigmentos carotenoides na concentração de 6,42mg/g. Estes pigmentos foram unicamente encontrados nestas frações.

Outro grupo de metabólitos encontrado nestas duas frações, (FH) e (FC), foram os fitoesteroides. Do total de fitoesteroides detectados, 60,98% foram encontrados na pesquisa da (FH) e somente 39,02% estavam presentes na (FC). Cabe salientar que estas classes de moléculas foram as únicas detectadas para estas frações.

Os grupos de substâncias fenólicas também foram quantificados. Dentre estas classes destacam-se os flavonoides, as antocianinas e os taninos. Observou-se o acúmulo dos flavonoides (43mg/g) somente na (FA), juntamente com taninos (6,02mg/g). Conforme um teor mais alto de fenólicos totais encontrados nesta fração, pode-se sugerir que aproximadamente a diferença aritmética entre a soma destes grupos (TFlaC e TTanC) e o teor de fenólicos totais (TPheC) apresenta uma relação com o teor de compostos fenólicos mais simples. Isto significa em termos práticos que aproximadamente 70,38% do conteúdo total de fenólicos encontrados nesta fração são compostos fenólicos simples.

A análise da (FM) revelou a presença de taninos na concentração de 6,02mg/g, e pelo mesmo raciocínio anterior, um teor de aproximadamente 92,42% de fenólicos simples. Estes metabólitos foram os únicos grupos detectados nesta fração.

Prosseguindo-se na análise dos teores de grupos de metabólitos chega-se à (FR), que foi a única fração a apresentar antocianinas (83,08mg/g), além de taninos (19,65mg/g).

5.1.4. Separação e Identificação dos Fitoconstituintes

Com base nos resultados anteriores as frações foram submetidas a técnicas cromatográficas com o intuito de isolar os fitoconstituintes presentes em cada fração.

5.1.4.1. Separação e Identificação dos Fitoconstituintes da (FH)

Uma amostra de 10g da (FH) foi submetida à cromatografia em coluna conforme as condições descritas na seção dos métodos deste trabalho e foram coletadas 100 frações de 10mL. Dentre as frações numeradas como 40 até 44 observou-se a precipitação de um sólido amorfo branco que foi exaustivamente lavado com éter de petróleo gelado e submetido à cromatografia em camada delgada. O método empregado para a avaliação das placas cromatográficas foi pela observação

em câmara de UV, seguido de revelação dos compostos da placa com vanilina sulfúrica. Observou-se a presença de somente uma mancha na placa quando avaliada após revelada e portanto as amostras foram reunidas e analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C , sob a codificação (FH-01).

Dentre as frações de 65 até 68 observou-se a formação de outro sólido branco amorfo que foi separado e tratado do mesmo modo descrito acima, pela lavagem sucessiva com éter de petróleo gelado. Os sólidos lavados foram avaliados por cromatografia em camada delgada e por apresentarem o mesmo perfil cromatográfico, foram reunidos. Este material foi codificado como (FH-02) e submetido às análises de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Os sinais apresentados pelos espectros da amostra (FH-01) em CDCl_3 , RMN de ^1H (FIGURA 14) e ^{13}C (FIGURA 15) foram analisados para a elucidação da sua estrutura química. Em análise ao espectro da (FIGURA 14) percebe-se a presença de sinais entre δ 0,5 e δ 2,5 bastante característicos de hidrogênios ligados a carbonos alifáticos. Nesta região existem 3 sinais que se apresentaram como singletos em δ 0,68, δ 0,69 e δ 1,01, que podem ser atribuídos a hidrogênios ligados em carbonos alifáticos. Este tipo de sinal normalmente é referente a grupos metila (CH_3) diretamente ligados a carbono quaternário.

Ainda em análise da (FIGURA 14) pode-se observar os sinais em δ 0,80, δ 0,83, 0,90 e δ 0,92, que se apresentam como uma série de dubletos, que segundo a literatura podem ser atribuídos a hidrogênios de um grupo metila (CH_3), quando este grupo encontra-se ligado a um grupo metino (CH).

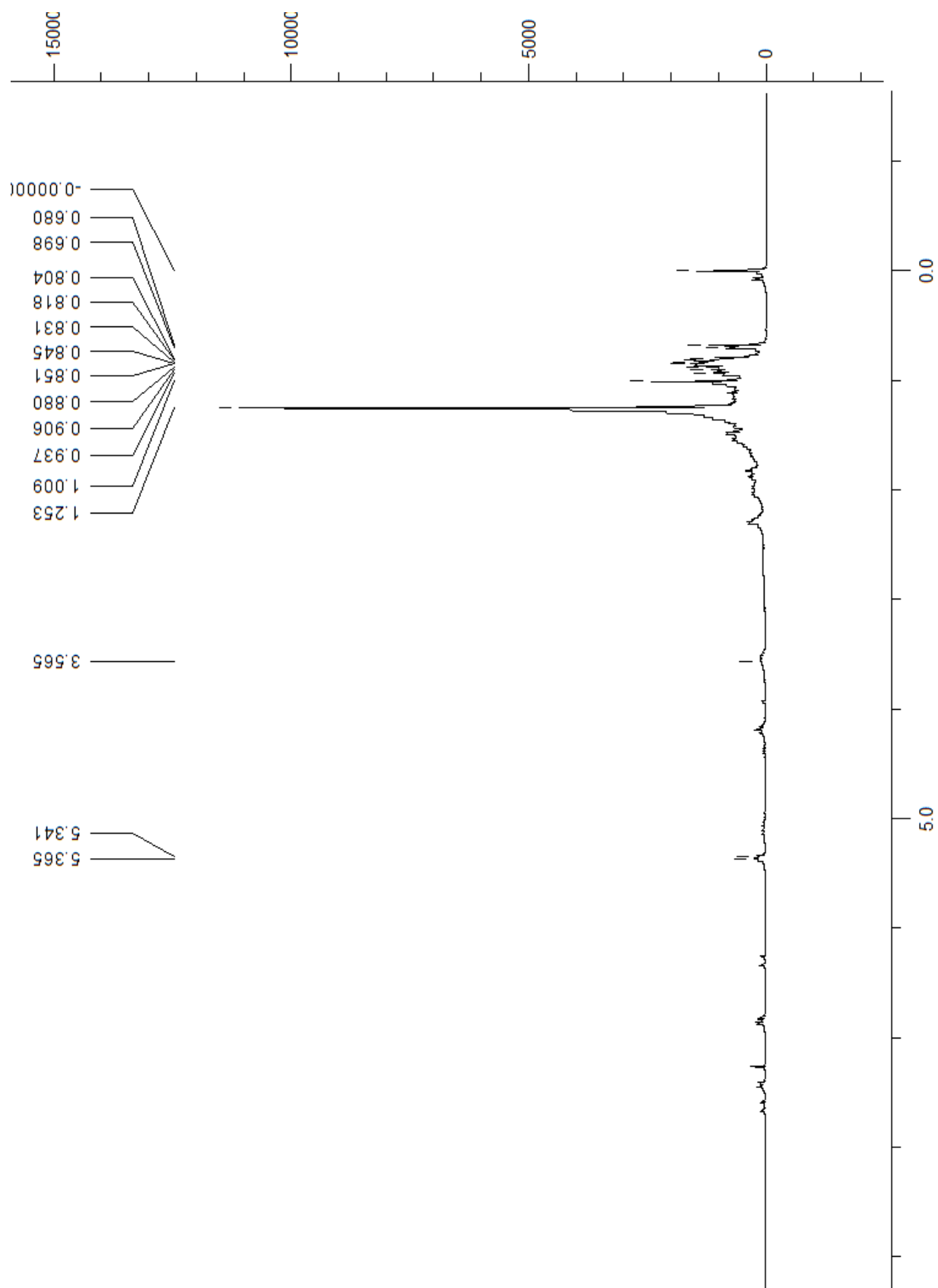


FIGURA 14: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200MHz) OBTIDO EM CDCl_3 PARA O SÓLIDO (FH-01).

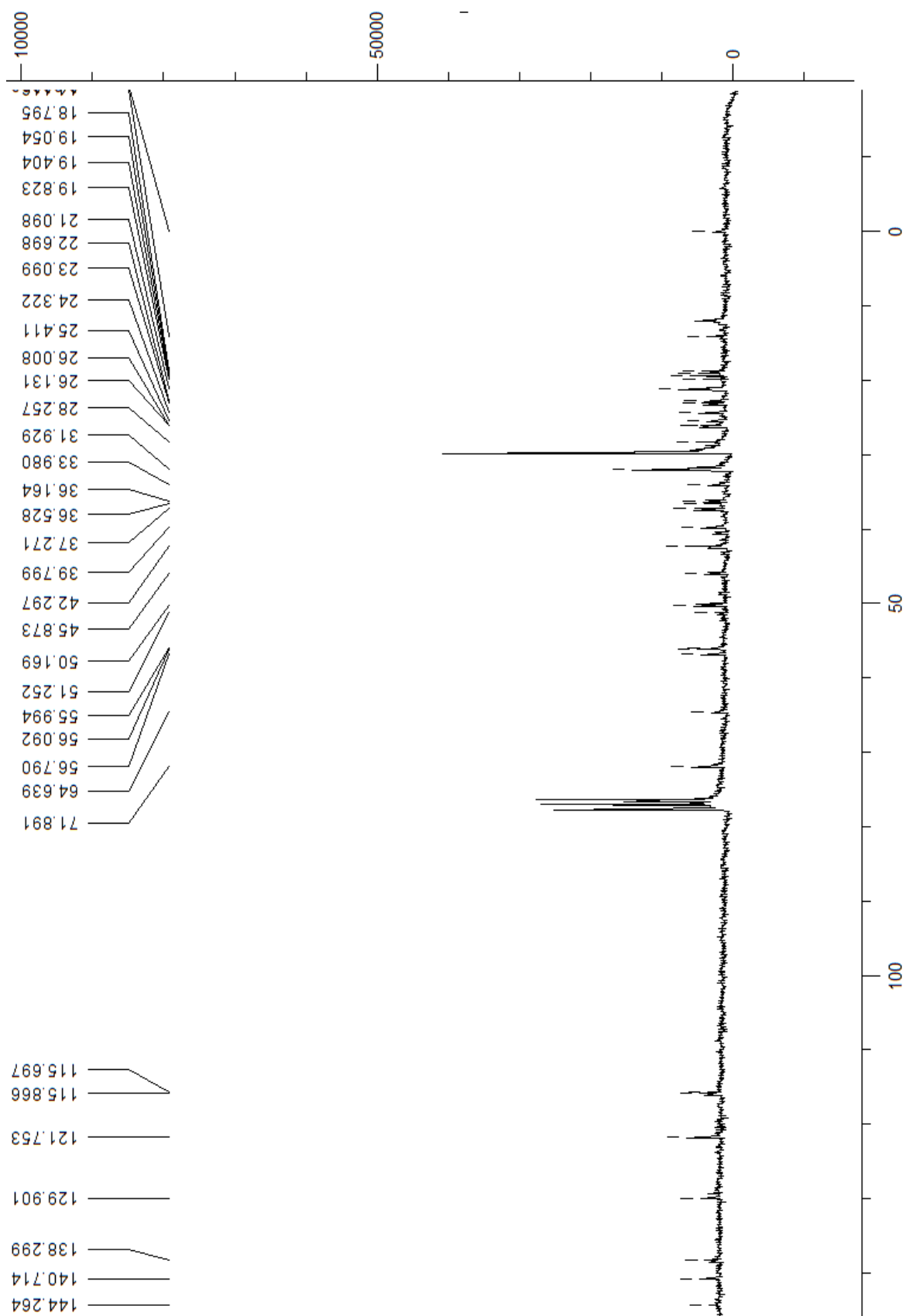


FIGURA 15: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C , 50MHz, OBTIDO EM CDCl_3 PARA O SÓLIDO (FH-01).

Com o δ em 3,56 percebe-se a presença de um sinal que foi caracterizado como um multipeto. O deslocamento deste sinal sugere que ele pode ser atribuído a um hidrogênio de grupo metino (CH), próximo a um grupo eletronegativo. Ainda, sua multiplicidade indica o acoplamento deste hidrogênio com hidrogênios de grupos metilênicos (CH₂). Segundo a literatura este sinal em δ 3,56 pode ser atribuído a um hidrogênio ligado a um carbono carbinólico, que normalmente é presente em núcleos esteroidais (GHOSH *et al*, 1985). As expansões destas regiões, entre δ 0,5 e δ 2,5 e entre δ 2,5 e 5,0, são apresentadas no anexo 4.

O espectro da (FIGURA 14) apresentou também um dupeto em δ 5,35 ($J=4,78$) que, pelo deslocamento químico e constante de acoplamento, sugere a presença de hidrogênio de carbono olefínico (MAHATO E KUNDU, 1994).

Sequencialmente o espectro de RMN de ¹³C (FIGURA 15) foi analisado para auxiliar na determinação da identidade desta amostra. Este espectro apresentou 31 sinais com deslocamentos químicos diferentes, sugerindo tratar-se de uma mistura de compostos da classe dos fitoesteroides. Os sinais em δ 140,73 e δ 121,77 podem atribuídos aos carbonos sp₂ numerados como C-5 e C-6 para o núcleo esteroidal. Para melhor visualização a (FIGURA 16) traz a numeração atualmente aceita para o fitoesteroide estigmasterol (1).

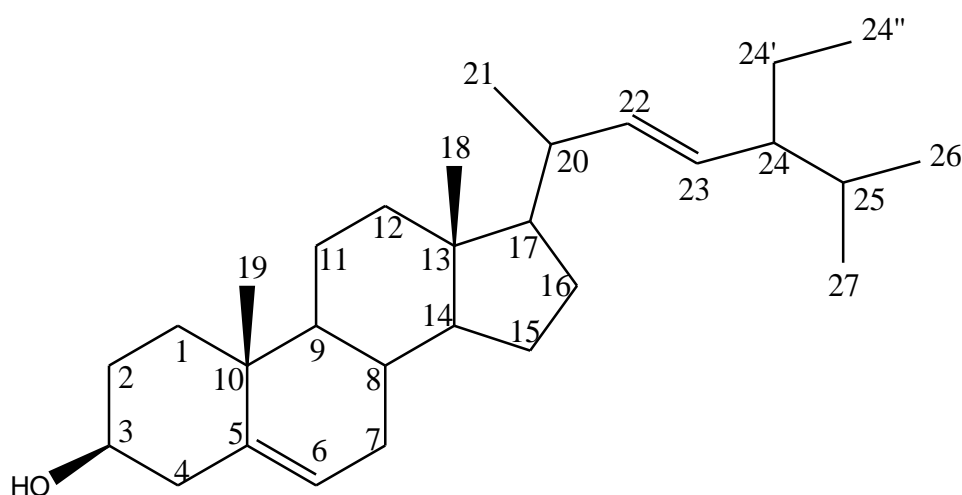


FIGURA 16: NUMERAÇÃO ATUALMENTE ACEITA PARA O FITOESTEROIDE ESTIGMASTEROL (1).

Fonte: Adaptado pelo autor (2014).

Conforme espectros apresentados e com base em comparações com a literatura (TABELA 6) o sólido (FH-01) foi identificado como sendo uma mistura dos compostos (1), (2) e (3), esteroides classicamente encontrados em espécies da família Fabaceae.

TABELA 6 - DADOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C PARA AS MOLÉCULAS DE ESTIGMASTEROL(1), β -SITOSTEROL (2) E CAMPESTEROL (3) OBTIDOS E COMPARADOS COM A LITERATURA.

Carbono	(1) δ descrito / encontrado	(2) δ descrito / encontrado	(3) δ descrito / encontrado
1	37,6 / 37,28	37,6 / 37,28	37,6 / 37,28
2	31,9 / 31,67	31,9 / 31,67	31,9 / 31,67
3	72,0 / 71,90	71,8 / 71,90	71,8 / 71,90
4	42,3 / 42,31	42,3 / 42,31	42,3 / 42,31
5	140,8 / 140,73	140,8 / 140,73	140,8 / 140,73
6	121,7 / 121,77	121,7 / 121,77	121,7 / 121,77
7	31,9 / 31,94	31,9 / 31,94	31,9 / 31,94
8	31,9 / 31,94	31,9 / 31,94	31,9 / 31,94
9	50,2 / 50,18	50,2 / 50,18	50,2 / 50,18
10	36,5 / 36,54	36,5 / 36,55	36,5 / 36,54
11	21,1 / 21,11	21,1 / 21,11	21,1 / 21,11
12	39,8 / 39,81	39,8 / 39,81	39,8 / 39,81
13	42,3 / 42,31	42,3 / 42,31	42,3 / 42,31
14	56,8 / 56,80	56,8 / 56,80	56,8 / 56,80
15	24,3 / 24,33	24,3 / 24,33	24,3 / 24,33
16	28,2 / 28,27	28,2 / 28,27	28,2 / 28,27
17	56,1 / 56,10	56,1 / 56,10	56,1 / 56,10
18	11,9 / 11,89	11,9 / 11,89	11,9 / 11,89
19	19,4 / 19,42	19,4 / 19,42	19,4 / 19,42
20	39,8 / 39,72	36,2 / 36,18	36,2 / 36,18
21	21,1 / 21,11	18,8 / 18,81	19,1 / 19,07
22	138,3 / 138,31	31,9 / 31,94	34,0 / 33,99
23	129,2 / 129,91	29,7 / 29,72	26,2 / 26,14
24	51,2 / 51,26	39,7 / 39,72	45,9 / 45,88
25	31,9 / 31,94	31,7 / 31,76	29,2 / 29,21
26	19,0 / 19,07	21,1 / 21,86	18,8 / 18,81
27	19,0 / 19,07	19,8 / 19,07	19,1 / 19,07
24'	26,2 / 26,14	18,8 / 18,81	23,1 / 23,11
24''	12,0 / 12,01	12,2 / 12,26	-

FONTE: MAHATO E KUNDU, 1994

Foram também observados os sinais com deslocamento em δ 138,31 e δ 129,91 que são característicos dos átomos de carbono da ligação dupla entre C-22 e C-23 característicos para o estigmasterol (1). O sinal em δ 71,90 pode ser atribuído ao carbono carbinólico (C-3) de estigmasterol (1), β -sitosterol (2) e campesterol (3).

Conforme Harbone *et al.* (1971) os fitoesteroides são característicos na família Fabaceae e estes compostos apresentam grande ocorrência dentro do gênero *Bauhinia*. Estigmasterol (1), β -sitosterol (2) e campesterol (3) já foram isolados de muitas espécies deste gênero, incluindo *B. candicans*, *B. guianensis*, *B. manca* e *B. splendens* (CECHINEL FILHO *et al.*, 1996), por serem lipídios de membrana celular, que garantem a sua fluidez. A (FIGURA 17) apresenta a estrutura química destas substâncias componentes da mistura (FH-01).

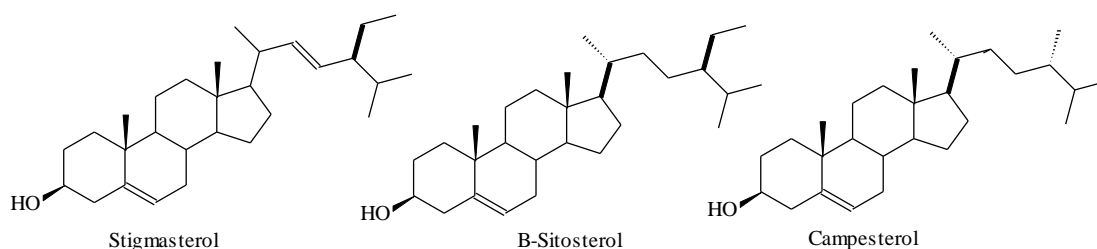


FIGURA 17: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTEROIDES ISOLADOS DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

O sólido codificado como (FH-02) foi solubilizado em CDCl_3 e analisado por RMN de ^1H (FIGURA 18) e RMN de ^{13}C (FIGURA 19).

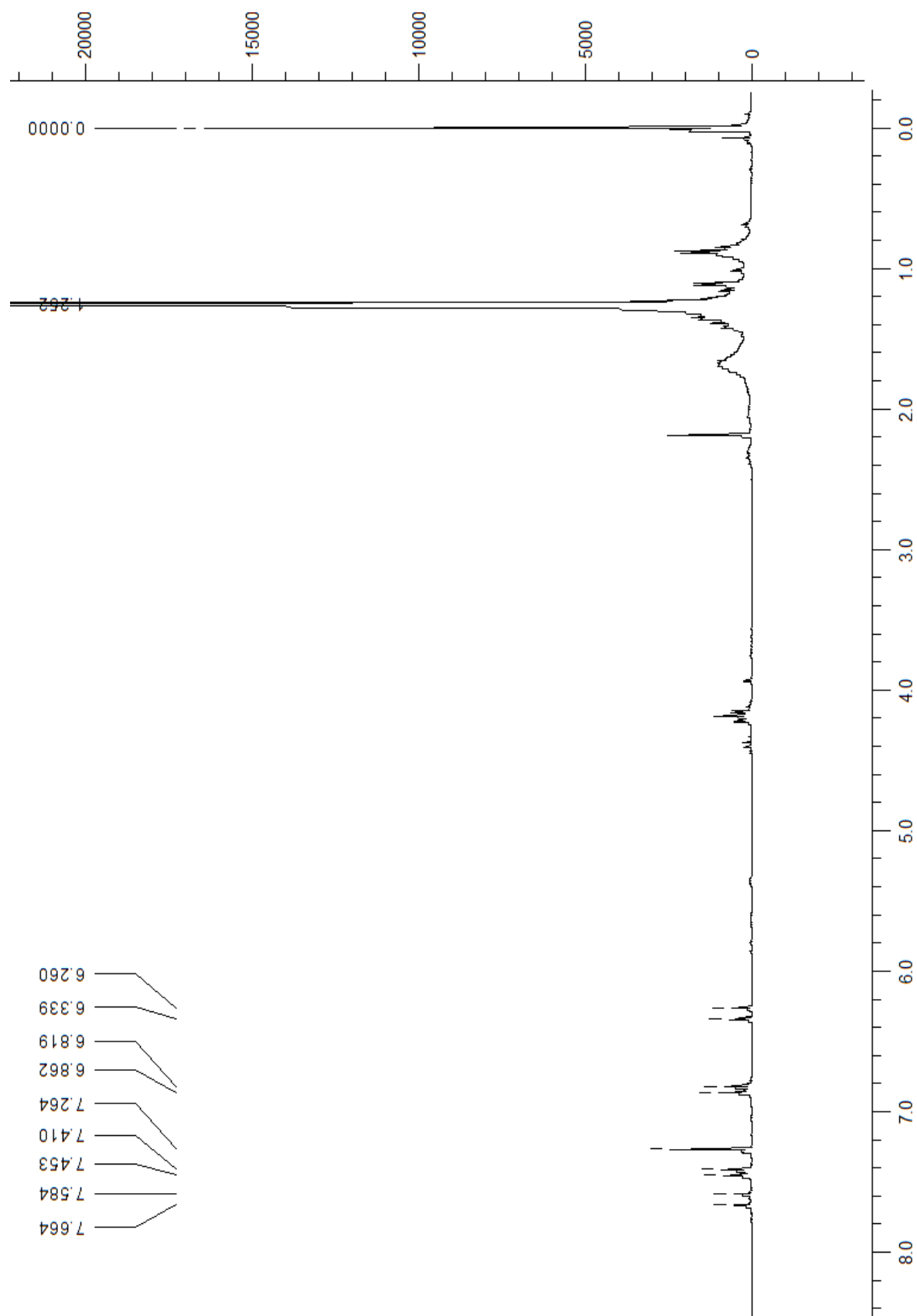


FIGURA 18: ESPECTRO DE RMN DE ¹H, 200MHz, OBTIDO EM CDCl₃ PARA O SÓLIDO (FH-02).

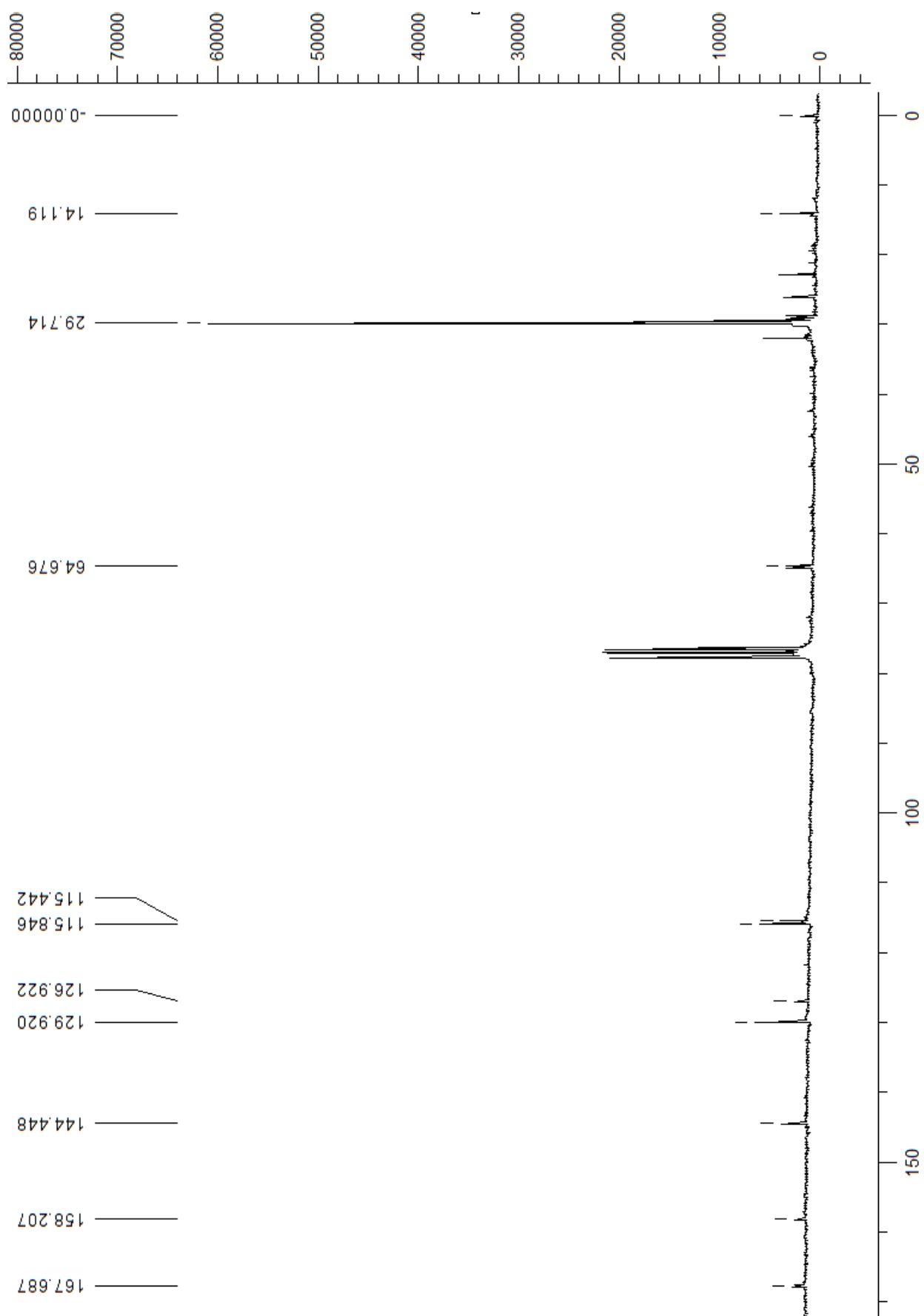


FIGURA 19: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C , 50MHz, OBTIDO EM CDCl_3 PARA O SÓLIDO (FH-02).

Em análise à região que compreende δ 6 até δ 8 do espectro de RMN de ^1H do composto (FH-02) apresentada pela (FIGURA 20), pode-se perceber a existência de 4 sinais bem resolvidos, além do sinal em δ 7,26. Em δ 6,30 pode-se observar um dubleto ($J=15,91\text{Hz}$) acoplando com o outro dubleto em δ 7,62 ($J=15,91\text{Hz}$). Tanto o deslocamento químico quanto a constante de acoplamento sugerem tratar-se de sinais referentes aos hidrogênios ligados a carbonos do tipo sp^2 olefínico, e em posição (*trans*) relativa entre eles.

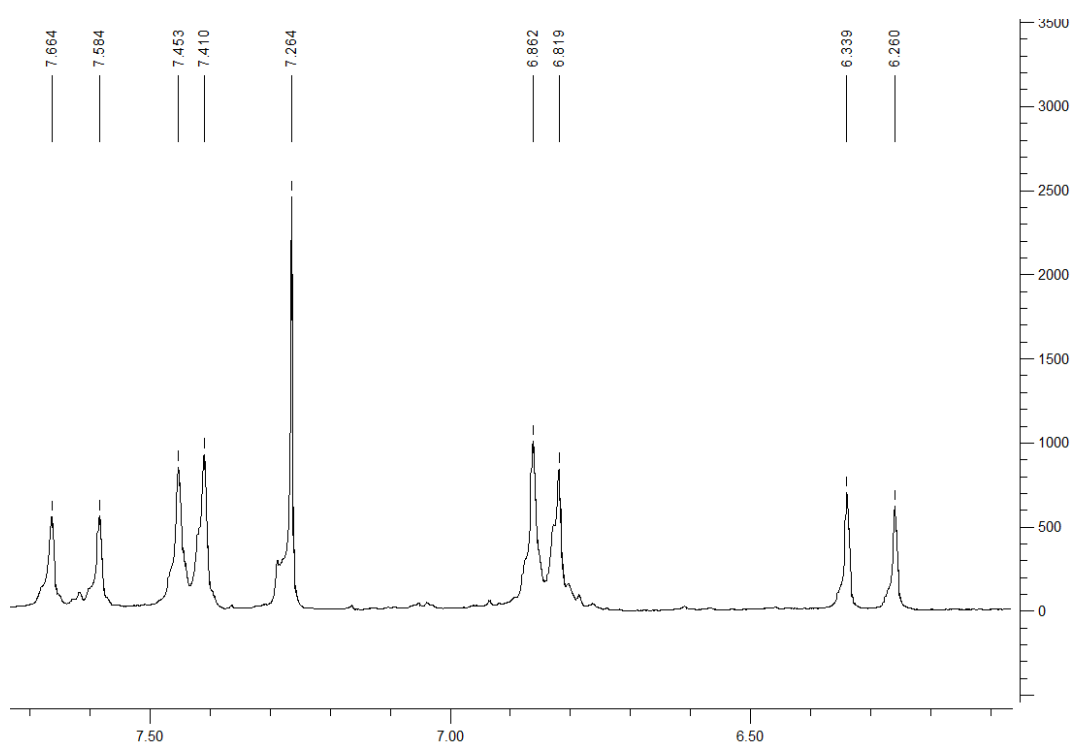


FIGURA 20: Expansão da região compreendida entre δ 6 até δ 8 do espectro de RMN de ^1H do composto (FH-02).

Os outros dois sinais existentes nesta região apresentam-se como dubletos. O primeiro em δ 6,84 ($J=8,59\text{ Hz}$) e o segundo em δ 7,43 ($J=8,59\text{ Hz}$), ambos integrando 2 hidrogênios. Isso mostra claramente que os hidrogênios de ambos estão acoplando entre si e tratam-se de dois grupos de 2 hidrogênios simétricos, padrão classicamente encontrado em anéis aromáticos *p*-substituídos.

Na sequência de elucidação estrutural analisou-se então a região do espectro compreendida entre δ 0 e δ 6 e considerou-se a possibilidade do único sinal

pertencente a substância majoritária da amostra ser o singlete em δ 1,25, pois todos os outros sinais não tem uma relação inteira com base na integração relativa entre os sinais anteriormente analisados.

Pelo fato de que a área calculada para este sinal em δ 1,25 foi muito maior que os sinais mostrados na (FIGURA 18) considerou-se a possibilidade de tratar-se de uma cadeia linear longa de carbonos alifáticos do tipo metileno, e pela procedência desta substância considerou-se também a possibilidade de ser um éster graxo do ácido *p*-cumárico.

Ao se analisar o espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 19) do composto (FH-02) percebe-se a presença de dez sinais, sendo que sete puderam ser atribuídos ao esqueleto carbônico de um derivado do ácido *p*-cumárico com δ 115,44 (C-3/C-5), δ 115,84 (C-8), δ 126,92 (C2/C-6), δ 129,92 (C-1), δ 144,44 (C-7), δ 158,20 (C-4), e em δ 167,68 (C-9) o grupo carbonila. Os outros três sinais foram atribuídos, em δ 64,67 (C-1') há a presença do grupo metilênico diretamente ligado ao átomo de oxigênio do grupo éster, em δ 29,71 há uma sequência de grupos metilênicos ligados de maneira linear, e em δ 14,11 há a metila terminal da cadeia alquílica lateral do tipo éster.

Para a determinação do tamanho da cadeia lateral deste éster procedeu-se análise em espectrômetro de massas em seu modo positivo. Considerou-se nesta análise a relação m/z de todos os compostos que apresentaram como fragmento o cátion acílico (FIGURA 21) estável, e que pudessem gerar perdas neutras com relação inteira as massas de álcoois graxos de cadeia longa. Após esta análise 3 espectros de massa foram obtidos, representados pelas (FIGURA 22), (FIGURA 23) e (FIGURA 24).

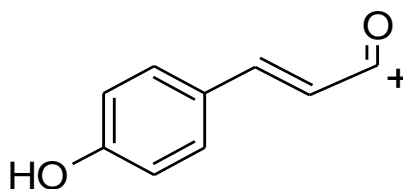


FIGURA 21: ESTRUTURA QUÍMICA DO CÁTION ACÍLICO ($m/z=147$) OBTIDO PELA FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS DA AMOSTRA (FH-02)

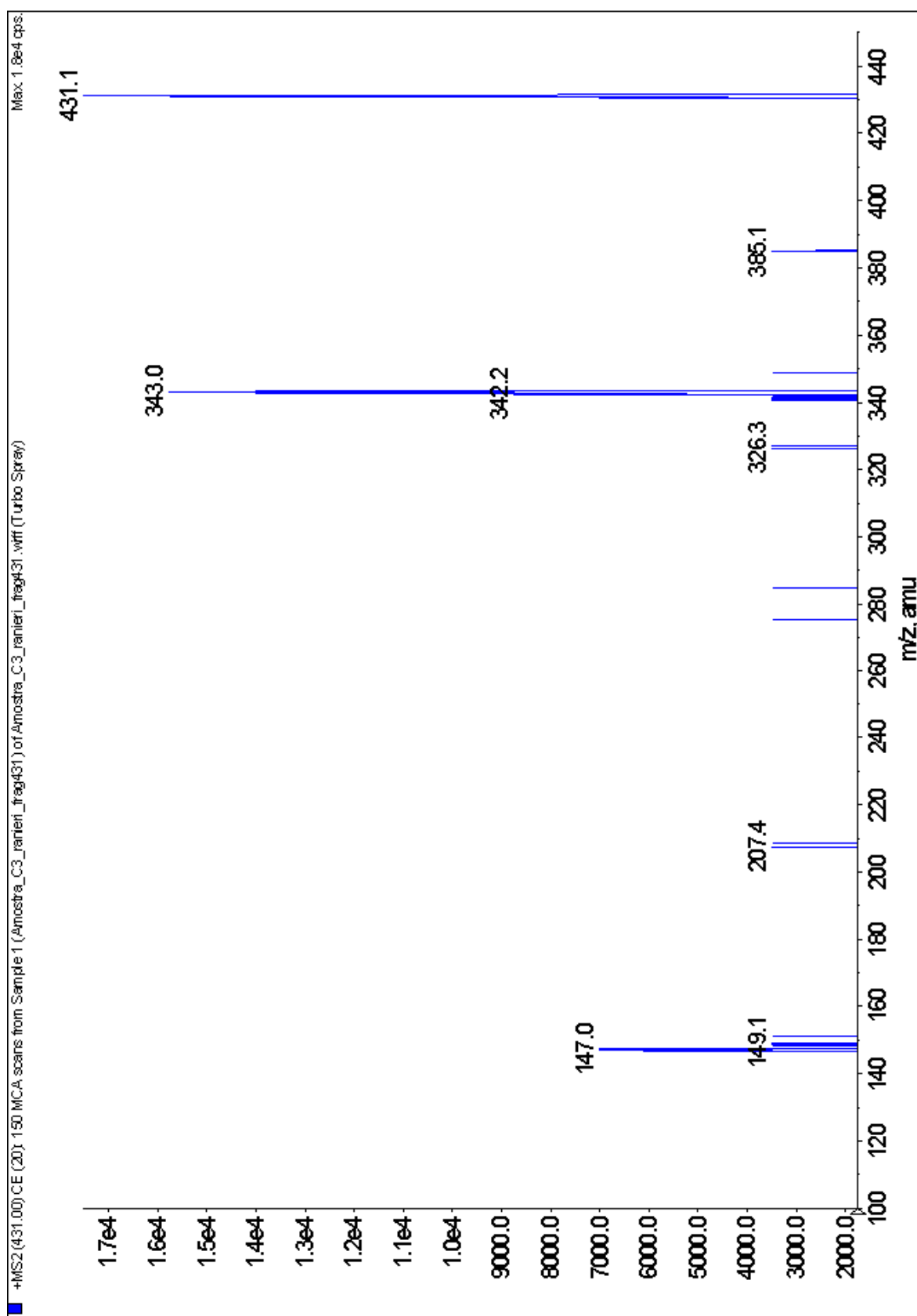


FIGURA 22: ESPECTRO DE MASSAS REALIZADO NO MODO POSITIVO PARA O COMPOSTO *p*-CUMARATO DE NONADECILA (18).

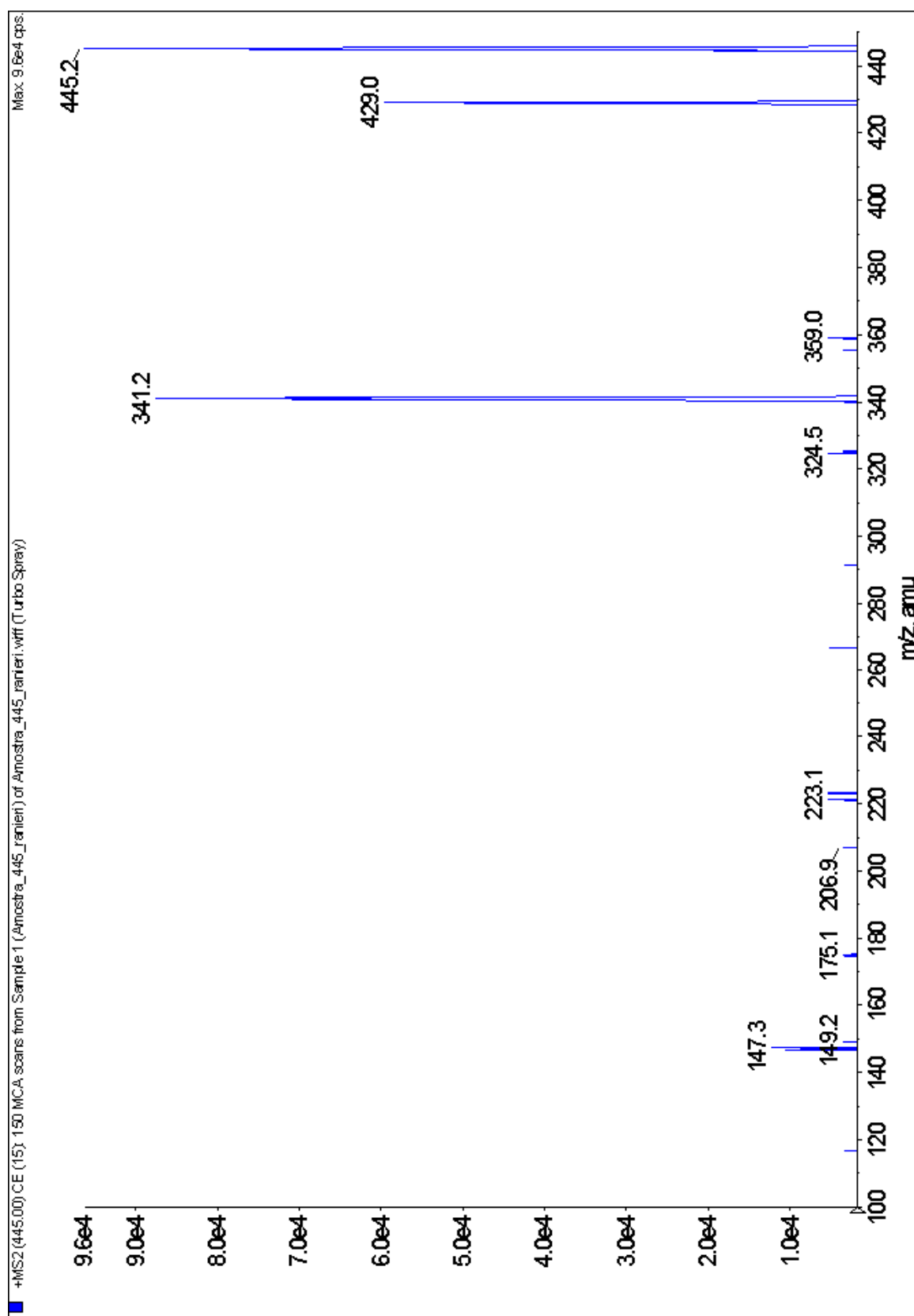


FIGURA 23: ESPECTRO DE MASSAS REALIZADO NO MODO POSITIVO PARA O COMPOSTO *p*-CUMARATO DE ARAQUIDILA (19).

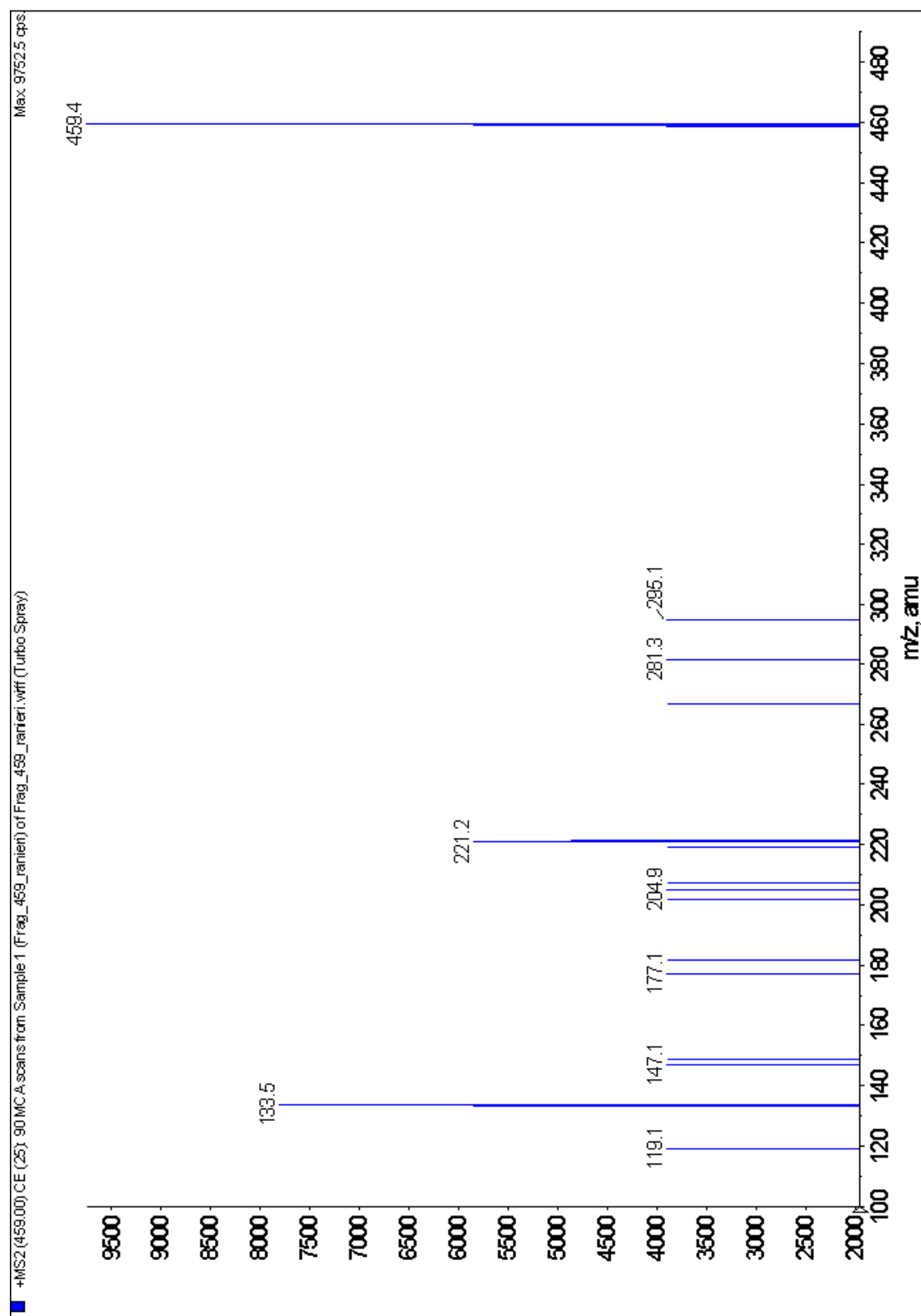


FIGURA 24: ESPECTRO DE MASSAS REALIZADO NO MODO POSITIVO PARA O COMPOSTO *p*-CUMARATO DE HENEICOSILA (20).

Três substâncias apresentaram como fragmento o cátion acílico e geraram perdas neutras com relação inteira as massas dos álcoois graxos de cadeia longa, que foram o álcool nonadecílico (15), o álcool araquidílico (16) e o álcool heneicosílico (17), apresentados na (FIGURA 25).

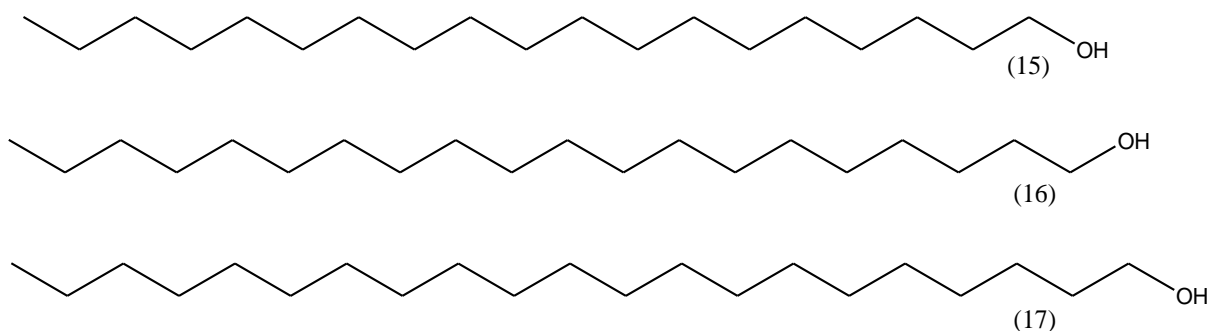


FIGURA 25: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁLCOOIS GRAXOS RESPONSÁVEIS PELA PERDA NEUTRA NAS ANÁLISES DE MASSA, REALIZADAS NO MODO POSITIVO.

Em análise ao espectro de massas da (FIGURA 22) percebe-se a presença do pico íon molecular ($m/z = 431,1$) que representa $[M+H]$ para o composto *p*-cumarato de nonadecila (18). O sinal ($m/z = 147,0$) representa a formação do cátion acílico derivado do ácido *p*-cumárico (9), que é facilmente estabilizado por ressonâncias dos elétrons π da carbonila. A cadeia lateral alquílica foi confirmada pela perda neutra de 284 conforme álcool graxo (15) apresentado na (FIGURA 25).

Esta mesma análise foi realizada monitorando-se agora o composto de ($m/z=445,2$) que representa $[M+H]$ para o composto *p*-cumarato de araquidila (19), gerando o espectro de massas da (FIGURA 23). Novamente pode-se perceber a existência de um fragmento ($m/z=147,3$) referente ao cátion acílico. Através da análise da perda neutra pode-se perceber uma perda de 298 compatível com o álcool graxo (16).

O terceiro monitoramento (FIGURA 24) foi realizado e encontrou-se o composto com ($m/z = 459,4$) que representa $[M+H]$ para o composto *p*-cumarato de heneicosila (20), e também verificou-se a presença do cátion acílico ($m/z=147,1$). Este composto apresentou perda neutra de 312, compatível com o álcool graxo (17).

Conforme estas análises a identidade da amostra (FH-02) foi revelada como se tratando da mistura de três ésteres do ácido *p*-cumárico (18), (19) e (20), com suas estruturas representadas na (FIGURA 26). Os espectros realizados no modo *Neutral loss* se encontram no anexo 4.

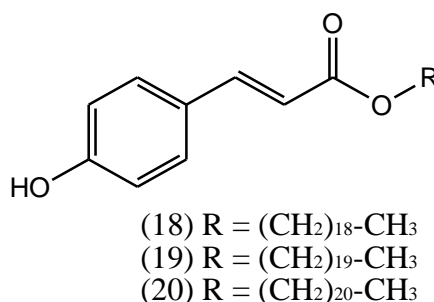


FIGURA 26: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÉSTERES DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO (18), (19), E (20).

Os dados espectroscópicos para cada substância são apresentados a seguir:

***p*-cumarato de Nonadecila (18):** Sólido branco amorfo; ESI *m/z* 431 [M+H, C₂₈H₄₇O₃]; Perda Neutra = 284; RMN ¹H [200 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 7,62 (d, 17,0 Hz, H-7), 7,43 (d, 8,0 Hz, H-2/H-6), 6,84 (d, 8,0 Hz, H3/H-5), 6,30 (d, 17 Hz, H-8), 4,20 (t, 6,8 Hz, H-1'), 0,85 (t, 7,5 Hz, CH₃); RMN ¹³C [50 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 167,68 (C-9), 158,20 (C-4), 144,44 (C-7), 129,92 (C-1), 126,92 (C-2/C-6), 115,84 (C-8), 115,44 (C-3/C-5), 65,67 (C-1'), 29,2-29,6 [(CH₂)_n], 14,11 (CH₃).

***p*-cumarato de Araquidila (19):** Sólido branco amorfo; ESI *m/z* 445 [M+H, C₂₉H₄₉O₃]; Perda neutra = 298; RMN ¹H [200 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 7,62 (d, 17,0 Hz, H-7), 7,43 (d, 8,0 Hz, H-2/H-6), 6,84 (d, 8,0 Hz, H3/H-5), 6,30 (d, 17 Hz, H-8), 4,20 (t, 6,8 Hz, H-1'), 0,85 (t, 7,5 Hz, CH₃); RMN ¹³C [50 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 167,68 (C-9), 158,20 (C-4), 144,44 (C-7), 129,92 (C-1), 126,92 (C-2/C-6), 115,84 (C-8), 115,44 (C-3/C-5), 65,67 (C-1'), 29,2-29,6 [(CH₂)_n], 14,11 (CH₃).

***p*-cumarato de Heneicosila (20):** Sólido branco amorfo; ESI m/z 459 $[M+H, C_{30}H_{51}O_3]$; Perda Neutra = 312; RMN 1H [200 MHz, δ (ppm), $CDCl_3$]: 7,62 (d, 17,0 Hz, H-7), 7,43 (d, 8,0 Hz, H-2/H-6), 6,84 (d, 8,0 Hz, H3/H-5), 6,30 (d, 17 Hz, H-8), 4,20 (t, 6,8 Hz, H-1'), 0,85 (t, 7,5 Hz, CH_3); RMN ^{13}C [50 MHz, δ (ppm), $CDCl_3$]: 167,68 (C-9), 158,20 (C-4), 144,44 (C-7), 129,92 (C-1), 126,92 (C-2/C-6), 115,84 (C-8), 115,44 (C-3/C-5), 65,67 (C-1'), 29,2-29,6 $[(CH_2)_n]$, 14,11 (CH_3).

O composto (19) é bem conhecido na literatura. Há relatos de sua identificação em espécies como *Artemisia annua* (MIZUSHINA *et al.*, 2010), mas nunca foi identificado em uma espécie do gênero *Bauhinia* antes. Por outro lado (18) e (20) são raramente identificados em espécies vegetais. A substância *p*-cumarato de nonadecila (18) foi isolada e identificada uma única vez por Correia, David e David (2003), e o *p*-cumarato de heneicosila (20) foi unicamente detectado por ESI – MS/ MS, após procedimentos de hidrólise a partir de *Hedera helix* L. por Santos *et al.* (2007). Esta é a primeira descrição de identificação do composto (20) sem procedimentos de hidrólise prévios em uma espécie vegetal.

Além disto, ambos (18) e (20) seguem uma rota metabólica incomum, pela esterificação de um álcool graxo de número ímpar de átomos de carbono com o ácido *p*-cumárico (9) e estes compostos podem ser utilizados como marcadores da espécie *B. glabra* dentro do gênero *Bauhinia*.

Além disto os *p*-cumaratos são também conhecidos por sua atividade em inibir as enzimas DNA polimerase e DNA topoisomerase (MIZUSHINA *et al.*, 2010), que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das células. Estes pesquisadores relataram em seus trabalhos o isolamento de alquil-*p*-cumaratos (isômeros *cis* de C_{20} , C_{22} e C_{24} ; Isômeros *trans* de C_{20} , C_{22} e C_{24}) isolados da espécie *Artemisia annua* e posterior síntese destes compostos.

Relataram ainda a avaliação da inibição enzimática de DNA polimerase e DNA topoisomerase, além de ensaios sobre o crescimento celular em câncer humano com resultados indicando que a substância (19) foi capaz de inibir fracamente a atividade da enzima DNA polimerase, e que suprimiu o crescimento de carcinoma de cólon humano (linhagem celular HCT116). Portanto estes ésteres, que desempenham um papel importante em dinâmica de populações com grande significado ecológico,

também devem ser mais explorados como potenciais agentes terapêuticos contra o câncer. A síntese e avaliação biológica destes ésteres merece maior atenção pela possibilidade de sua utilização como modelo para a síntese de novos agentes antineoplásicos.

5.1.4.2. Separação e Identificação dos Fitoconstituintes da (FC)

Uma amostra de 10g da (FC) foi submetida a separação cromatográfica conforme especificado nos métodos deste trabalho e 150 frações de 10mL foram recolhidas. Estas frações foram deixadas para evaporar a temperatura ambiente e as amostras secas foram analisadas por cromatografia em camada delgada utilizando-se como eluente as mesmas misturas de solventes empregadas na coluna preparativa. O conteúdo dos frascos que apresentaram perfil cromatográfico semelhante quando reveladas foi reunido.

A partir dos frascos numerados como 40 até 50 observou-se a presença de compostos que emitiam fluorescência quando avaliados sob luz ultravioleta então foram reunidos e submetidos à nova cromatografia.

Novas 50 subfrações foram recolhidas e avaliadas sob luz ultravioleta. Dentre as subfrações entre 24 e 30 pôde-se observar a presença de uma substância majoritária. Estas amostras foram reunidas e submetidas a cromatografia em camada delgada preparativa de onde se pôde extrair um composto que após secagem se apresentou como um sólido branco. Este sólido foi codificado como (FC-01) e foi submetido a RMN de ^1H (FIGURA 27) e RMN de ^{13}C (FIGURA 28) e os sinais foram atribuídos principalmente por comparação com a literatura (NOGUEIRA *et al.*, 2013).

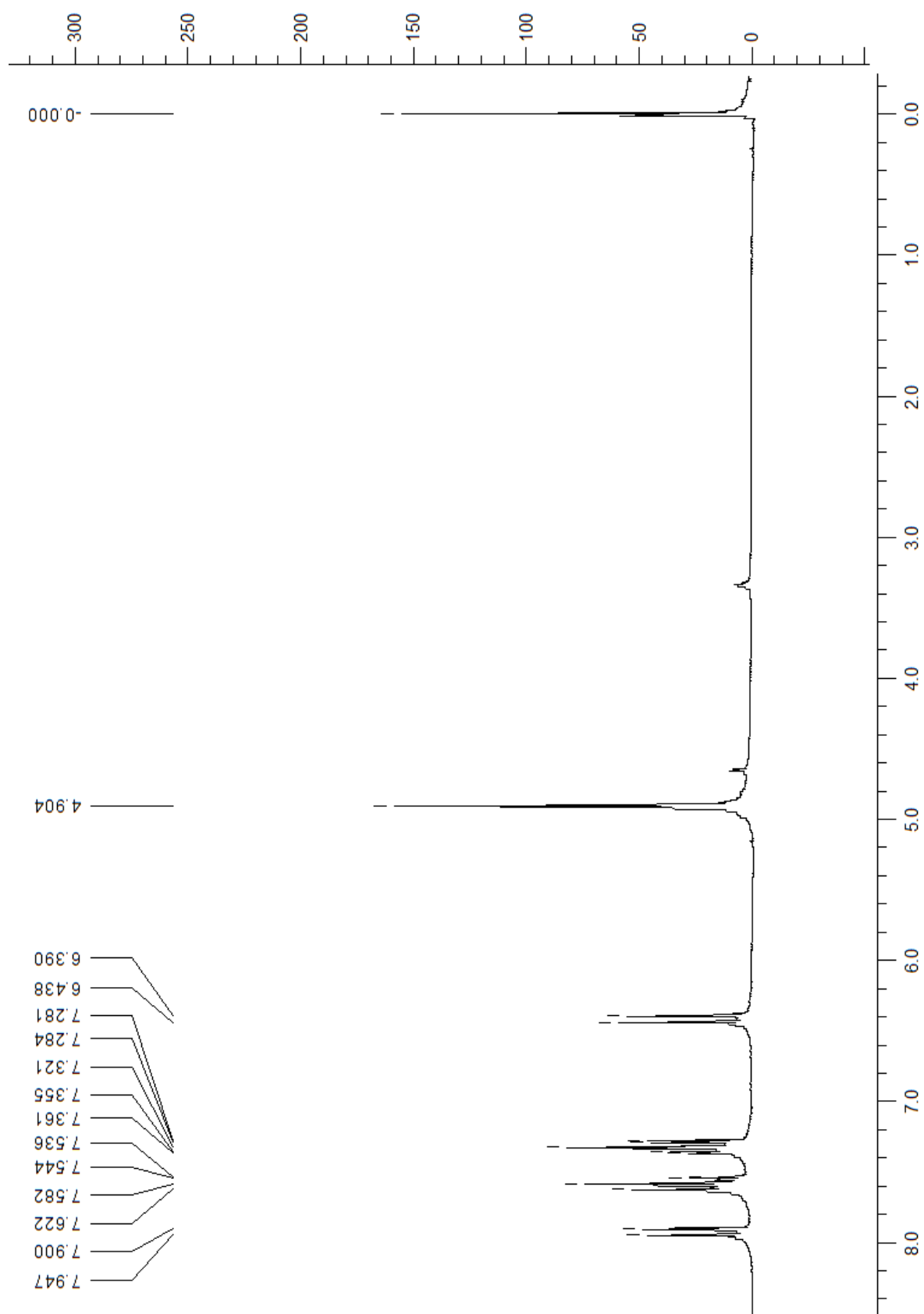


FIGURA 27: ESPECTRO DE RMN DE ^1H , 200MHz, OBTIDO EM MeOD PARA O SÓLIDO (FC-01).

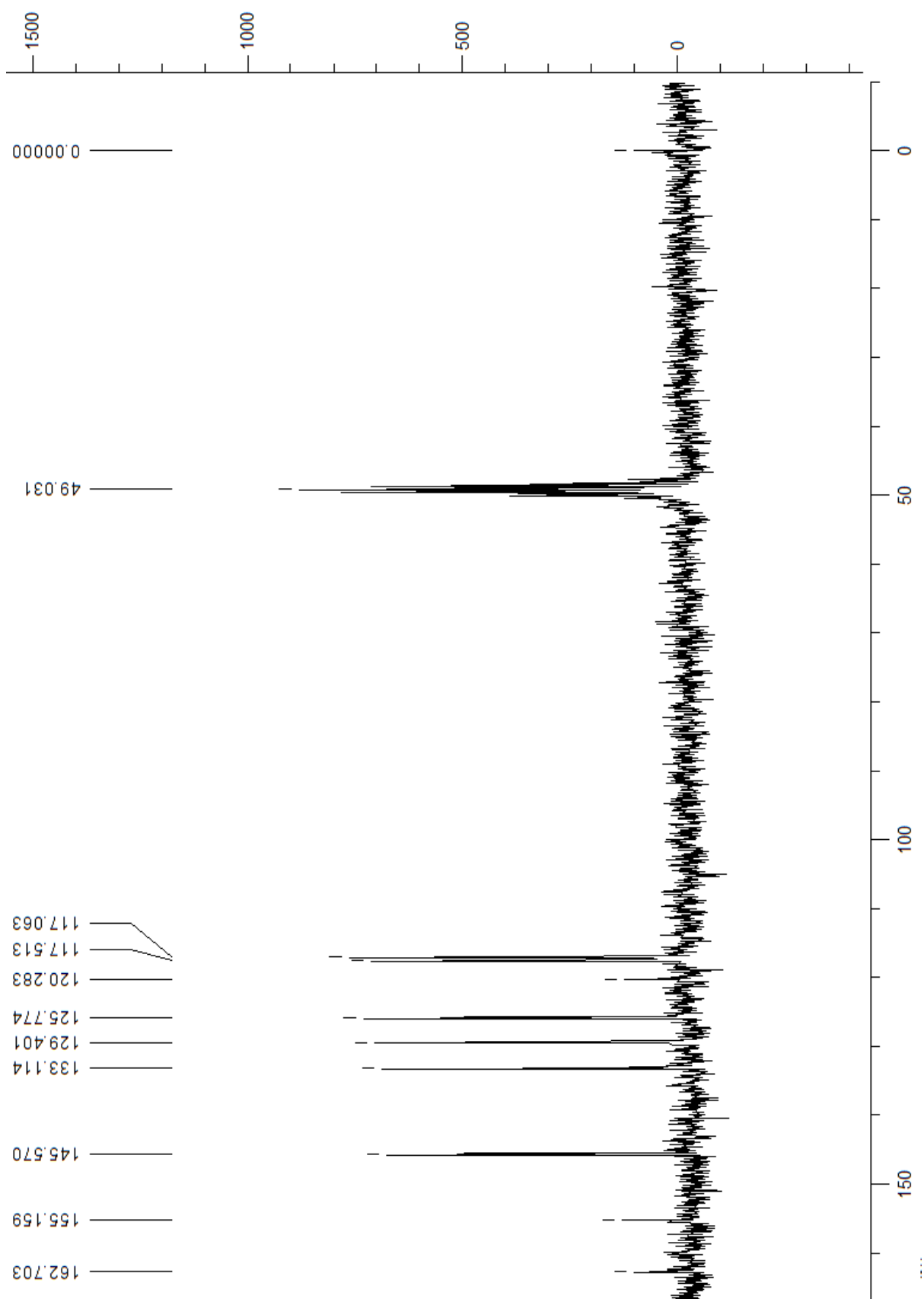


FIGURA 28: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C , 50MHz, OBTIDO EM MeOD PARA O SÓLIDO (FC-01).

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 27) apresentou dois sinais que se caracterizados como duplos-duplos-dubletos, em δ 7,32 ($J=7,9; 6,6; 1,7\text{Hz}$) e em δ 7,56 ($J=7,9; 6,6; 1,7\text{Hz}$), acoplando entre si. Com base no seu deslocamento químico e na multiplicidade que apresentaram estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios acoplando com mais dois outros em posição relativa (*orto*), e mais um hidrogênio próximo em posição relativa (*meta*) de um anel aromático.

Os sinais que se caracterizaram como dubletos, apresentados com δ 7,92 (d, $J=9,4\text{Hz}$, 1H), e δ 6,41 ($J=9,53\text{ Hz}$, 1H), podem ser atribuídos a um sistema olefínico, em que os hidrogênios acoplam entre si em posição relativa (*trans*). Devido ao deslocamento químico pode-se supor tratar-se de uma dupla ligação próxima a um grupo eletronegativo.

Ao se analisar o espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 28) do composto (FC-02) percebe-se a presença de nove sinais que puderam ser atribuídos a molécula da cumarina simples (6). Os sinais com δ 117,51, δ 145,57, δ 120,28, δ 129,40, δ 125,77, δ 133,11, δ 117,06, δ 155,15, possuem deslocamento químico compatível com carbonos de anel aromático, e em δ 162,70 percebe-se a presença de um sinal que pode ser atribuído a um grupo carbonila. Os dados espectroscópicos são apresentados resumidamente abaixo:

Cumarina (**6**): Sólido branco cristalino; RMN ^1H [200MHz, δ (ppm), MeOD]: 7,51 (1H, d, $J=9,4\text{Hz}$, H-3), 6,20 (1H, d, $J=9,4\text{ Hz}$, H-4), 7,30 (1H, dd, $J=6,4; 1,25\text{Hz}$, H-5); 7,06 (1H, ddd, $J=7,86, 6,4; 1,0\text{ Hz}$, H-6), 7,35 (1H, ddd, $J=7,86, 6,4; 1,25\text{ Hz}$, H-7), 7,12 (1H, dd, $J=7,0; 1,0\text{ Hz}$, H-8); RMN ^{13}C [50MHz, δ (ppm), MeOD]: 162,70, 117.51, 145.57, 120.28, 129,40, 125.77, 133.11, 117.06, 155.15.

5.1.4.3. Separação e Identificação dos Fitoconstituintes de (FA)

Uma amostra de 2g da (FA) foi submetida a cromatografia em coluna conforme condições estabelecidas previamente. O total de 100 frações de 10mL foram recolhidas e foram deixadas para evaporar a temperatura ambiente.

As amostras secas foram analisadas por cromatografia em camada delgada e a partir dos frascos numerados como 20 até 25 observou-se a presença de um composto que emitia fluorescência. Estas frações foram novamente purificadas. Dentre as novas subfrações 14-18 pôde-se observar a presença de uma substância majoritária, que foi separada por camada delgada preparativa e codificada como (FA-01). Esta amostra foi submetida a RMN de ^1H (FIGURA 29) e RMN de ^{13}C (FIGURA 30).

O espectro de RMN de ^1H da (FIGURA 29) apresentou principalmente sinais referentes aos hidrogênios de anel aromático. O padrão de substituição percebido pela análise deste espectro foi muito similar aquele apresentado pelos *p*-cumaratos identificados anteriormente.

Ambos os sinais em δ 7,45 (d, $J=8,41\text{Hz}$) e δ 6,81 (d, $J=8,41\text{Hz}$) podem ser atribuídos aos hidrogênios de um anel aromático e a constante de acoplamento indica (*para*)-substituição, com hidrogênios em posição (*orto*) relativa. Os sinais em δ 7,60 (d, $J=15,91\text{Hz}$) e δ 6,28 (d, $J=15,91\text{Hz}$) estão de acordo com aqueles apresentados por sistema olefínico com posição relativa (*trans*) entre si.

Já o espectro de RMN de ^{13}C da (FIGURA 30) apresentou sete sinais que foram compatíveis com os sinais apresentados pelo ácido *p*-cumárico (9). O sinal em δ 171,04 pode ser atribuído ao carbono de um grupo carboxila, enquanto ambos os sinais em δ 146,68 e δ 115,58 podem ser atribuídos aos carbonos sp^2 de um sistema olefínico.

Além disto o sinal em δ 127,24 pode ser atribuído ao carbono diretamente ligado a um grupo hidroxila e os sinais em δ 131,08 e δ 116,82 foram atribuídos aos carbonos de um anel aromático, sugerindo uma vez mais um padrão de *p*-substituição, em acordo com a literatura (YI *et al.*, 2010).

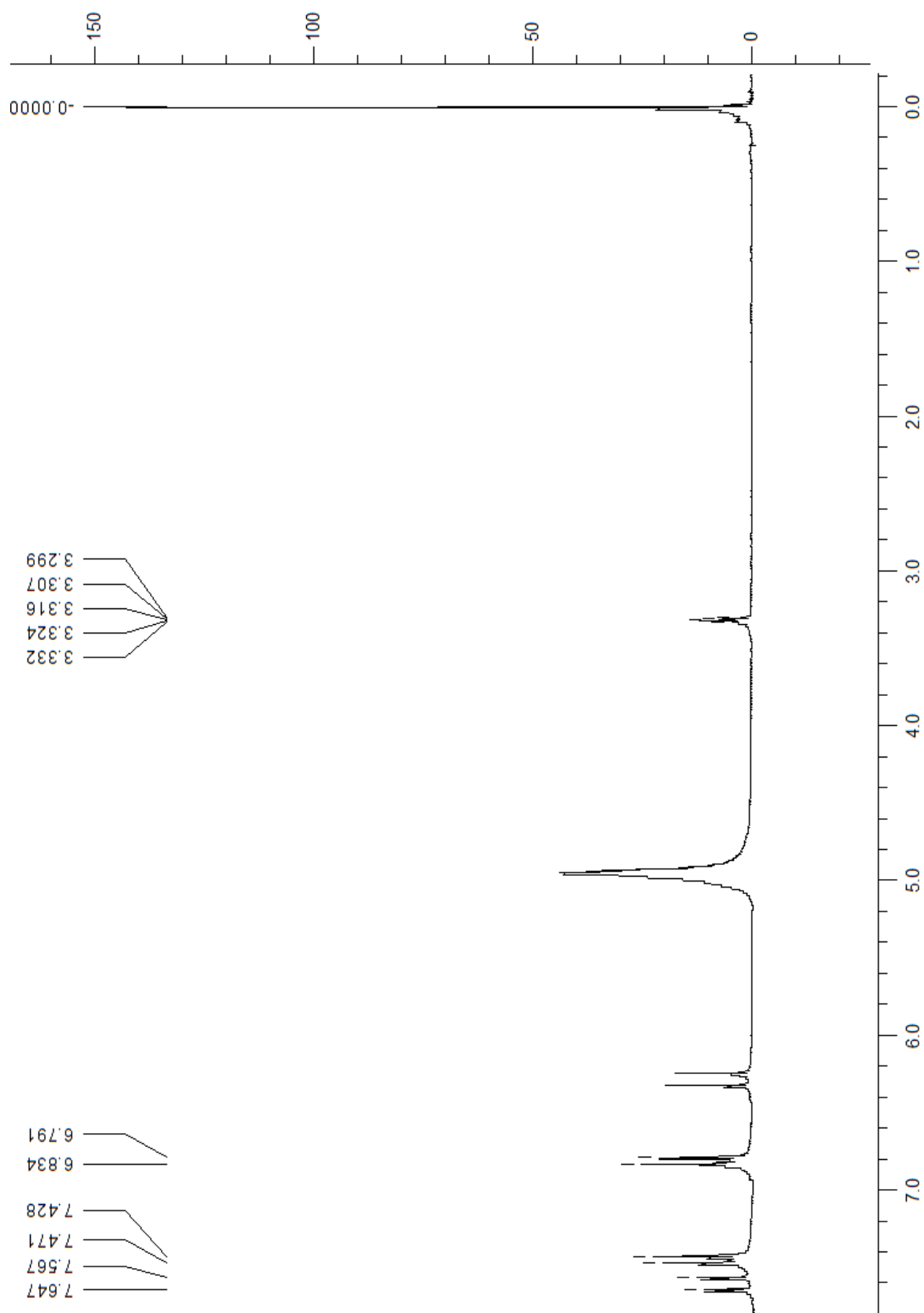


FIGURA 29: ESPECTRO DE RMN DE ^1H , 200MHz, OBTIDO EM MeOD PARA O SÓLIDO (FA-01).

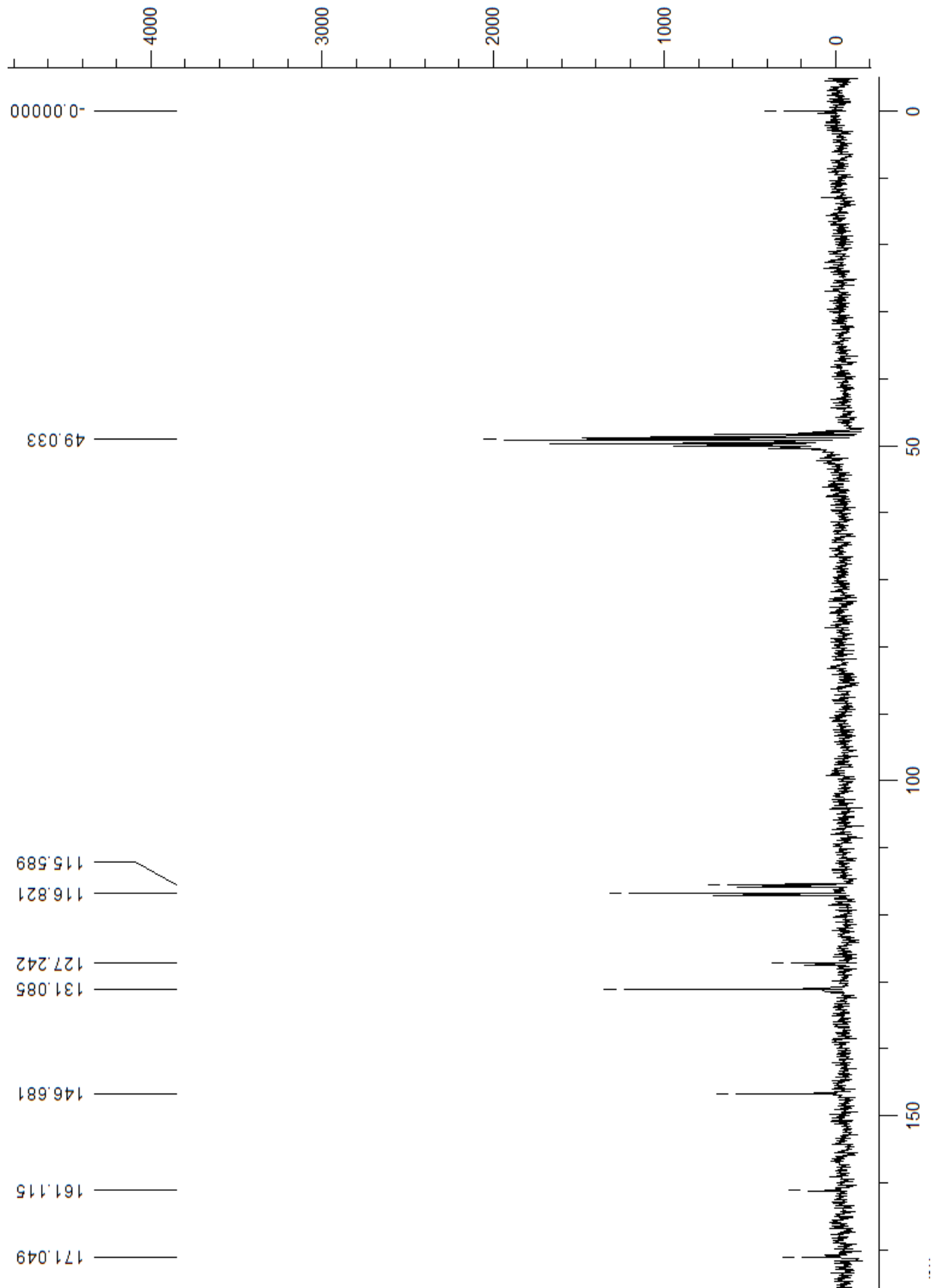


FIGURA 30: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C , 50MHz, OBTIDO EM MeOD PARA O SÓLIDO (FA-01).

O composto (FA-01) foi identificado como sendo o ácido p-cumárico (9) e os dados espectroscópicos são apresentados abaixo de maneira resumida.

Ácido p-cumárico (**9**): Sólido branco cristalino; RMN ^1H [200MHz, δ (ppm), MeOD]: 7.56 (1H, d, J = 15.8, H-7), 7.42 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2/ 6), 6.77 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3/ 5), 6.25 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8); RMN ^{13}C [50MHz, δ (ppm), MeOD]: 171,04, 161,11, 146,68, 131,08, 127,42, 116,82, 115,58.

5.2.RESULTADOS PARA A AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO *in vitro*

Nesta seção são apresentados os resultados encontrados na avaliação do potencial biológico *in vitro* realizada para o (EB) de *B. glabra* e frações com relação às propriedades antioxidantes e à toxicidade preliminar.

5.2.1. Resultados Referentes aos Ensaio para a Avaliação do Potencial Antioxidante

Todos os resultados obtidos para esta avaliação estão reunidos na (TABELA 7) e conforme pode ser observado todas as amostras ensaiadas apresentaram potencial antioxidante sobre os modelos propostos em extensões diferentes. A seguir se encontram os resultados, separadamente, por modelo.

Segundo Pozo-Insfran, Brenes e Talcott (2004) e Bianchi e Antunes (1999) é importante que o potencial antioxidante seja avaliado não somente por um método. Esta afirmação vai ao encontro do fato que antioxidantes podem apresentar resultados diferentes para métodos diferentes.

Quando se delimitam testes para esta avaliação devem ser levados em consideração aspectos como polaridade da matriz avaliada, natureza da espécie reativa de oxigênio (ERO) e tipo de substrato que será protegido pelo antioxidante.

TABELA 7 - RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

	DPPH (IC _{50%})	Fosfomolibdênio (IC _{50%})	TBARS (IPL%)	Meta (%)
Control. Neg.	-	-	-	10,24 ^b ± 0,24
Control. Pos.	5,76 ^a ± 0,62	100,00 ^a ± 0,32	52,31 ^c ± 2,29	-
FH	162,29 ^f ± 0,72	62,63 ^b ± 1,26	73,54 ^a ± 2,74	7,28 ^a ± 0,45
FC	13,76 ^b ± 0,23	64,40 ^b ± 0,73	56,02 ^{bc} ± 1,92	10,77 ^b ± 0,44
FA	37,54 ^c ± 0,85	19,13 ^d ± 0,66	15,86 ^d ± 2,05	10,99 ^b ± 0,41
FM	13,49 ^b ± 0,45	42,79 ^c ± 0,52	9,81 ^{de} ± 2,58	10,81 ^b ± 0,34
FR	58,17 ^e ± 0,61	9,20 ^e ± 0,63	7,20 ^e ± 2,09	9,25 ^c ± 0,39
EB	52,32 ^d ± 0,45	37,54 ^c ± 0,47	59,32 ^b ± 2,69	8,77 ^c ± 0,32

NOTA: DADOS FORAM EXPRESSOS COMO MEDIA±DESVIO PADRÃO (n=3 POR GRUPO); AS MEDIAS FORAM COMPARADAS POR ANOVA DE UMA VIA (p<0,05); CONTROLES POSITIVOS: DPPH (ÁCIDO ASCÓRBICO), FOSFOMOLIBDÊNIO (ÁCIDO ASCÓRBICO), TBARS (BHT), META HEMOGLOBINA (ÁCIDO ASCÓRBICO); CONTROLE NEGATIVO: AMOSTRAS SEM TRATAMENTO; (FH) FRAÇÃO HEXANO, (FC) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (FA) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (FM) FRAÇÃO METANOL, (FR) FRAÇÃO REMANESCENTE, (EB) EXTRATO BRUTO; (IC_{50%}) ÍNDICE DE CAPTURA DE 50%, (IPL%) ÍNDICE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA, META (%) PORCENTAGEM DE META HEMOGLOBINA.

5.2.1.1. Resultados Obtidos para a Avaliação do Potencial Antioxidante pelo Método do DPPH

O ensaio do DPPH, que expressa a dose mínima para capturar 50% (IC_{50%}) dos radicais do DPPH, foi realizado para o (EB) e frações (TABELA 7). As medias foram agrupadas em 6 categorias (p<0,05) das quais o controle positivo (ácido ascórbico) mostrou o melhor resultado com IC_{50%} em uma concentração de 5,76µg/mL, seguido pelas frações (FC) com a concentração de 13,76µg/mL e (FM) com a concentração de 13,49µg/mL.

A terceira categoria incluiu (FA), com IC_{50%} igual a uma concentração de 37,54µg/mL, seguida pelo (EB) com IC_{50%} em 52,32µg/mL.

Ambas as frações, (FR) e (FH) apresentaram os resultados menos significativos, com concentrações altas para IC_{50%}, em 58,17µg/mL e 162,29 µg/mL, respectivamente. Os resultados do ensaio do DPPH apresentam-se como parâmetros preliminares importantes para a pesquisa de novos antioxidantes naturais

principalmente quando estes apresentam-se antioxidantes em pequenas concentrações. A (FIGURA 31) apresenta os resultados para esta análise.

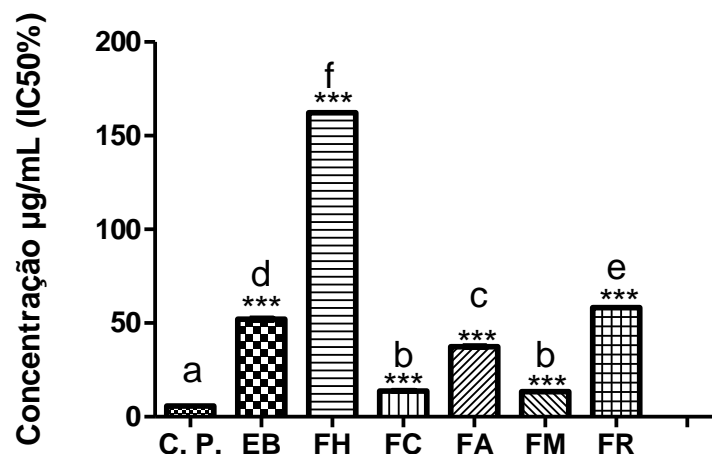


FIGURA 31: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DO DPPH PARA O (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: CADA COLUNA REPRESENTA A MÉDIA±DESVIO PADRÃO DE 3 AMOSTRAS DO (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE PARA O ENSAIO DO DPPH. OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS (*) APRESENTAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$); AS LETRAS EM CIMA DAS BARRAS REPRESENTAM OS GRUPOS ESTATÍSTICOS; (EB) EXTRATO BRUTO, (FH) FRAÇÃO HEXANO, (FC) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (FA) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (FM) FRAÇÃO METANOL, (FR) FRAÇÃO REMANESCENTE, (CONTR. POS) CONTROLE POSITIVO.

5.2.1.2. Resultados Obtidos para a Avaliação do Poder Redutor pelo Método do Fosfomolibdênio

Este método apresenta o poder redutor das amostras ensaiadas. As médias foram agrupadas em 5 categorias ($p < 0,05$) dentre as quais o padrão ácido ascórbico foi considerado como tendo 100% de poder redutor.

Ambas as frações (FH) e (FC) apresentaram os melhores resultados, com 60,99% e 64,40% do poder redutor do ácido ascórbico na concentração de 200µg/mL, respectivamente. As frações (FM) com um poder redutor de 42,79% e o (EB) com um poder redutor de 37,54% forma o terceiro grupo. A quarta categoria tem como representante a (FA) com o poder redutor medido em 19,13%, seguida da quinta

categoria, (FR), com o poder redutor de 9,20µg/mL. A (FIGURA 32) apresenta os resultados.

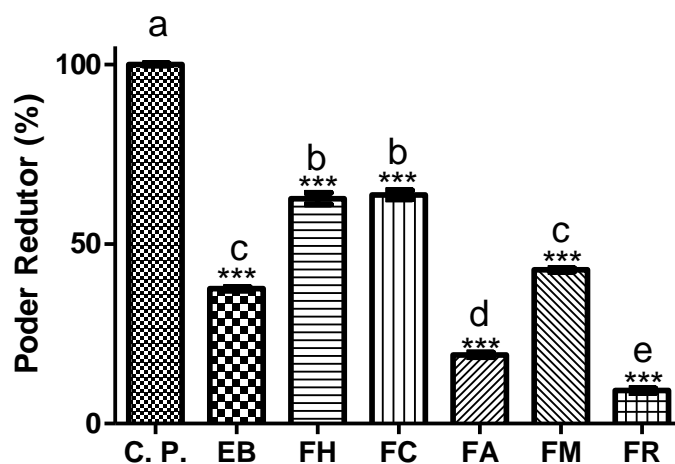


FIGURA 32: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DO PODER REDUTOR PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO, EXPRESSOS COMO A MÉDIA±DESVIO PADRÃO DE 3 AMOSTRAS PARA O (EB) E FRAÇÕES *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS (*) APRESENTAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$); AS LETRAS EM CIMA DAS BARRAS REPRESENTAM OS GRUPOS ESTATÍSTICOS; (EB) EXTRATO BRUTO, (FH) FRAÇÃO HEXANO, (FC) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (FA) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (FM) FRAÇÃO METANOL, (FR) FRAÇÃO REMANESCENTE, (CONTR. POS.) CONTROLE POSITIVO.

5.2.1.3. Resultados Obtidos para a Avaliação do Índice de Inibição da Peroxidação Lipídica pelo Método do TBARS

Este método apresenta a porcentagem de inibição da lipoperoxidação pelas amostras ensaiadas. As médias foram agrupadas em 5 categorias ($p < 0,05$), entre as quais o controle positivo butilhidroxitolueno (BHT) inibiu 52,31% da peroxidação, sendo igual a (FC) com uma inibição de 56,02%. Não há diferenças significativas entre os resultados da (FC), com inibição de 56,02%, e a inibição provocada pelo (EB) que foi de 59,32%. Porém o potencial de (EB) é claramente maior que o apresentado pelo controle BHT. O melhor resultado foi a inibição de 73,54% da lipoperoxidação pela (FH). As (FA) com a inibição de 15,86% e (FM) com a inibição de 9,81% foram agrupadas apresentando baixa atividade, seguidas pela (FR) com apenas 7,20% de

inibição. Não há diferenças estatisticamente significativas entre a atividade da (FM) e a apresentada pela (FR). A (FIGURA 33) apresenta os resultados desta análise. Os dados de peroxidação lipídica são um importante parâmetro de medida no que tange ao estresse oxidativo e ao dano celular.

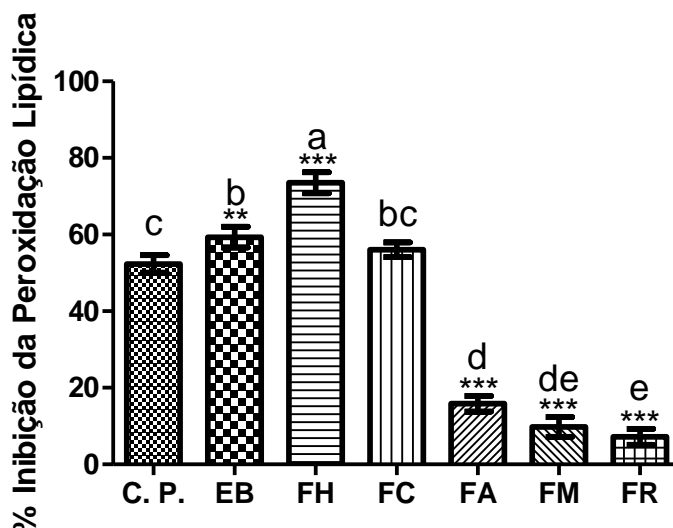


FIGURA 33: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELO MÉTODO DO TBARS, EXPRESSOS COMO A MÉDIA±DESVIO PADRÃO DE 3 AMOSTRAS PARA O (EB) E FRAÇÕES *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS (*) APRESENTAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$); AS LETRAS EM CIMA DAS BARRAS REPRESENTAM OS GRUPOS ESTATÍSTICOS; (EB) EXTRATO BRUTO, (FH) FRAÇÃO HEXANO, (FC) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (FA) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (FM) FRAÇÃO METANOL, (FR) FRAÇÃO REMANESCENTE, (CONTR. POS.) CONTROLE POSITIVO.

5.2.1.4. Resultados Obtidos para a Avaliação do Conteúdo Total de Meta Hemoglobina

A avaliação da capacidade antioxidante das amostras sobre eritrócitos apresenta o poder redutor das amostras em um ambiente biológico complexo. Este poder redutor relaciona-se com a conversão de meta hemoglobina (Fe^{3+}) em oxi hemoglobina (Fe^{2+}), reduzindo o estresse oxidativo hematológico.

As medias foram agrupadas em 3 categorias ($p < 0,05$) entre as quais (FH) apresentou o mais alto potencial de recuperação. Ambas as amostras (FR) e (EB) apresentaram uma pequena atividade, conforme os resultados apresentados anteriormente na (TABELA 8).

As frações (FC), (FA) e (FM) não apresentaram resultados com diferença significativa com relação ao controle negativo. Os resultados estão apresentados na (FIGURA 34).

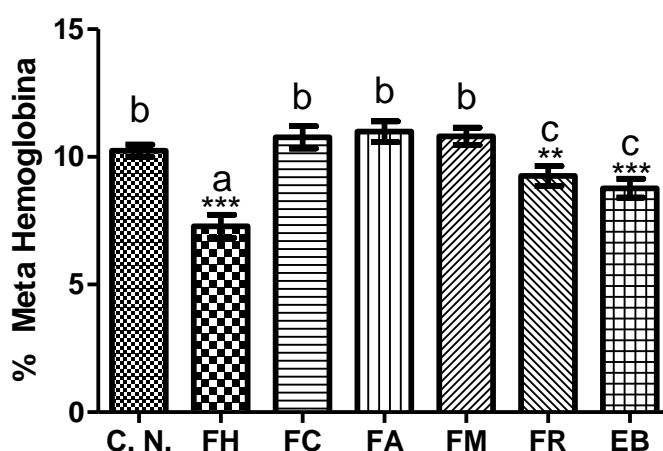


FIGURA 34: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DA RECUPERAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE META HEMOGLOBINA, EXPRESSOS COMO A MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO DE 3 AMOSTRAS PARA O (EB) E FRAÇÕES *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS (*) APRESENTAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$); AS LETRAS EM CIMA DAS BARRAS REPRESENTAM OS GRUPOS ESTATÍSTICOS; (EB) EXTRATO BRUTO, (FH) FRAÇÃO HEXANO, (FC) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (FA) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (FM) FRAÇÃO METANOL, (FR) FRAÇÃO REMANESCENTE; (C.N.) CONTROLE NEGATIVO.

5.2.1.5. Análise de Correlação Multivariada entre as Características Químicas do (EB) e frações de *Bauhinia glabra* Jacq., Fabaceae e o Potencial Antioxidante

Há algum tempo já se sabe que os metabólitos secundários encontrados em plantas desempenham um papel importante relacionado com as dinâmicas de populações, a propagação e proteção das espécies. Por esta razão uma ampla gama de classes destes metabólitos apresenta diferentes potenciais biológicos, os quais

podem afetar diretamente as funções fisiológicas das espécies animais que se alimentam destas plantas. A (FIGURA 35) apresenta os resultados comparados do potencial antioxidante do extrato dos troncos de *B. glabra*.

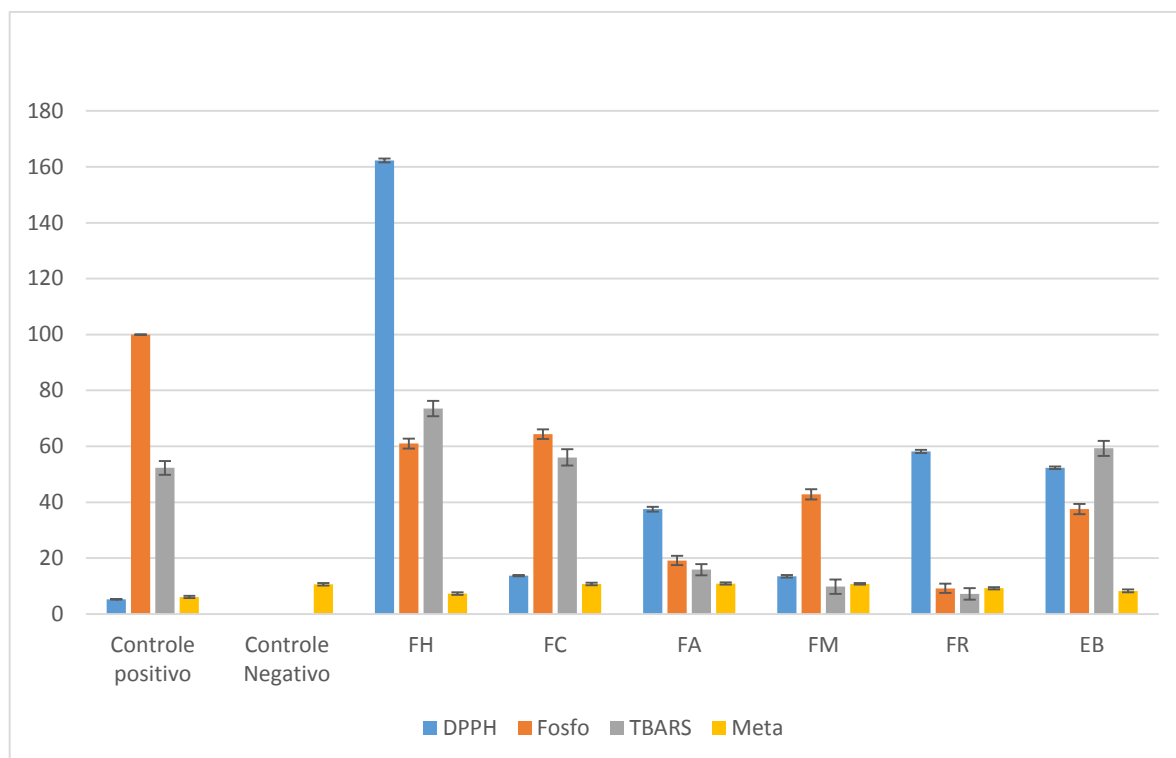


FIGURA 35: APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS COMPARADOS PARA OS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA O (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE. NOTA: CADA COLUNA APRESENTA A $MEDIA \pm DESVIO$ PADRÃO DE 3 AMOSTRAS PARA O (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE PARA OS ENSAIOS DO DPPH, FOSFOMOLIBDÊNIO (FOSFO), TBARS, E RECUPERAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE META HEMOGLOBINA (META). OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS APRESENTAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$). (EB) EXTRATO BRUTO, (FH) FRAÇÃO HEXANO, (FC) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (FA) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (FM) FRAÇÃO METANOL, (FR) FRAÇÃO REMANESCENTE.

A similaridade química entre as amostras, (EB) e frações, foi correlacionada com os resultados realizados para a determinação do potencial antioxidante por análise de componente principal (ACP), que está apresentada na (FIGURA 36). Com base nos resultados obtidos foi possível dividir as amostras em quatro grupos distintos.

O primeiro grupo (grupo 1) é composto pelas (FH) e (FC) que exibem o maior conteúdo de fitoesteróis. Outro grupo pode ser percebido (grupo 2) que é composto

pelo (EB) e por (FM) e são as amostras que apresentaram o maior teor de compostos fenólicos. A (FA) compõe o terceiro grupo (grupo 3) e parece ter alguma ligação à distância com as amostras do grupo 2.

Finalmente a (FR), que compõem o grupo 4, não exibiu similaridade com as outras frações porém parece possuir alguma relação com os outros grupos por possuir um componente positivo (estreitando relação com as amostras do grupo 2 e 3) e um componente negativo (estreitando relação com as amostras do grupo 1).

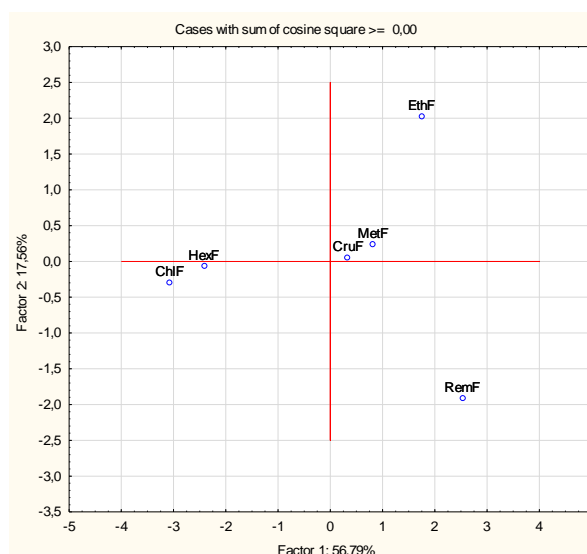


FIGURA 36: SIMILARIDADE QUÍMICA EXISTENTE ENTRE O (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE RELACIONADA TAMBÉM COM A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS, OBTIDA POR ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (ACP) REALIZADA COM AUXÍLIO DO SOFTWARE STATISTICA 10.0.

NOTA: AS AMOSTRAS FORAM CONSIDERADAS SIMILARES QUANDO LOCALIZADAS NO MESMO QUADRANTE E COM O MÁXIMO DE UM QUADRADO. AS AMOSTRAS FORAM CONSIDERADAS COMO APRESENTANDO LIGAÇÃO QUANDO PELO MENOS UM COMPONENTE APRESENTOU O MESMO SINAL; (CruF) EXTRATO BRUTO, (HexF) FRAÇÃO HEXANO, (ChIF) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (EthF) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (MetF) FRAÇÃO METANOL, (RemF) FRAÇÃO REMANESCENTE.

Com base nos resultados apresentados acima a contribuição de cada grupo de metabólitos sobre as propriedades antioxidantes pôde ser determinada por análises de distâncias Euclidianas de ligação (FIGURA 37) e de acordo com esta análise os resultados do ensaio do DPPH parecem ser o principal parâmetro sobre todos os outros métodos. Quando se analisou a correlação entre todos os grupos de metabólitos e este ensaio, todas as amostras apresentaram resultados estatisticamente significativos, indicando que este método é bastante abrangente para

a avaliação preliminar do potencial de uso de substâncias para o combate do estresse oxidativo. Pôde-se perceber também que os compostos fenólicos aumentam significativamente a resposta da amostra para este ensaio.

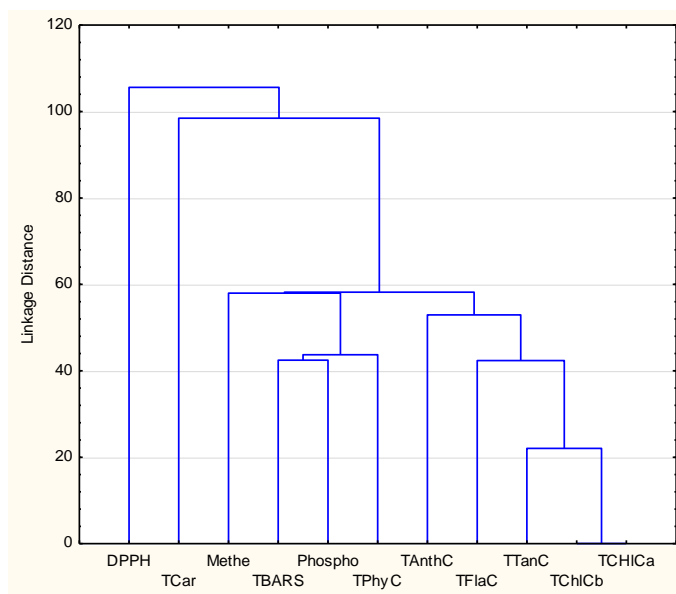


FIGURA 37: ANÁLISE DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS ENTRE OS TEORES DE METABÓLITOS E AS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES.

NOTA: A FIGURA APRESENTA A DISTÂNCIA DE LIGAÇÃO (EIXO Y) E A CORRELAÇÃO ENTRE O PARÂMETRO (EIXO X); PARÂMETROS DIRETAMENTE PROPORCIONAIS SÃO AVALIADOS PELA PROXIMIDADE EM (EIXO X) E PARÂMETROS INVERSAMENTE PROPORCIONAIS SÃO AVALIADOS A LONGA DISTÂNCIA; (TCar) CAROTENOIDES TOTAIS, (TPhyC) FITOESTERÓIS TOTAIS, (TFlaC) FLAVONOÍDES TOTAIS, (TAnthC) CIANIDINAS TOTAIS, (TTanC) TANINOS TOTAIS, (TChlCa) CLOROFILA A TOTAL, (TChlCb) CLOROFILA B TOTAL.

Além disso, estes compostos fenólicos parecem estar pouco relacionados com a inibição da peroxidação lipídica e também pouco relacionados com a recuperação de meta hemoglobina. Os compostos fenólicos são melhor conhecidos por sua notável capacidade de agir como antioxidantes frente ao ensaio do DPPH, e na maioria dos casos estes compostos desempenham um importante papel contra o estresse oxidativo.

A influência dos compostos lipofílicos (TPhyC), (TCarC) e (TChlCa) e (TChlCb), presentes nas amostras (FH) e (FC) que fazem parte do grupo 1, sobre os resultados dos ensaios do potencial antioxidante foi também analisada para os métodos do TBARS e frente a recuperação do conteúdo de meta hemoglobina (FIGURA 38). Uma maior correlação parece existir entre estas classes de metabólitos

e a inibição da peroxidação lipídica e também sobre a recuperação da meta hemoglobina. Os (TCarC), (TChlCa) e (TChlCb) parecem não apresentar relação direta com essas propriedades. O (TPhyC) apresenta a menor distância de ligação e maior proximidade e portanto os resultados sobre a peroxidação lipídica e redução da hemoglobina podem ser atribuídos a este metabólito.

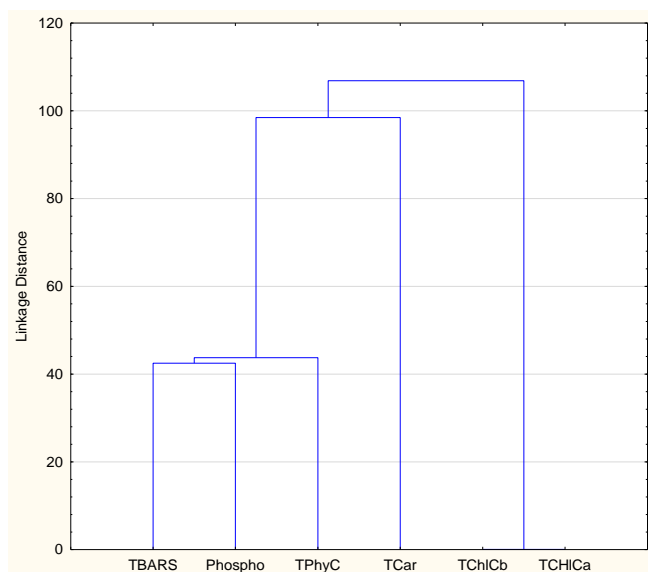


FIGURA 38: ANÁLISE DE DISTÂNCIAS EUCLIDIANAS ENTRE OS TEORES DE METABÓLITOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DO GRUPO 1 E OS RESULTADOS DOS ENSAIOS DO TBARS E DO PODER REDUTOR PELO FOSFOMOLIBDÊNIO.

NOTA: A FIGURA APRESENTA A DISTÂNCIA DE LIGAÇÃO (EIXO Y) E A CORRELAÇÃO ENTRE O PARÂMETRO (EIXO X); PARÂMETROS DIRETAMENTE PROPORCIONAIS SÃO AVALIADOS PELA PROXIMIDADE EM (EIXO X) E PARÂMETROS INVERSAMENTE PROPORCIONAIS SÃO AVALIADOS A LONGA DISTÂNCIA; (TCar) CAROTENOIDES TOTAIS, (TPhyC) FITOESTEROIS TOTAIS, (TChlCa) CLOROFILA A TOTAL, (TChlCb) CLOROFILA B TOTAL, (PHOSPHO) PODER REDUTOR.

Estes resultados estão de acordo com a literatura uma vez que fitoesteroides são muito similares aos lipídeos da membrana celular. Além desta propriedade cabe salientar que os fitoesteroides são bem conhecidos por suas propriedades biológicas, como hipocolesterolêmica, anti-inflamatória, imunomoduladora, e mais recentemente foi observada uma relação entre o processo de peroxidação lipídica e estes metabólitos. Foi observado que estes compostos agem como antioxidantes em solução e fisicamente nas membranas as estabilizando (YOSHIDA E NIKKI, 2003; DELANEY *et al.*, 2004).

Esta informação reafirma os resultados desta análise uma vez que a FH apresentou baixo potencial em capturar o radical DPPH, mas uma alta atividade em inibir a peroxidação lipídica e também sobre a recuperação do conteúdo de hemoglobina oxidada em suspensão de eritrócitos.

O método complexométrico do fosfomolibdênio apresentou informações importantes relacionadas ao mecanismo desta capacidade antioxidante mencionada. As análises estatísticas apresentaram a relação entre os compostos fenólicos e os resultados observados para o ensaio do DPPH, e também a relação entre o (TPhyC) e a recuperação da hemoglobina oxidada. Ambos os grupos de amostras, grupo 1 e grupo 2, exibiram estreita relação com o poder redutor. Isto mostra que fenólicos e os (TPhyC) possuem propriedades antioxidantes como aceitadores de elétrons.

5.2.2. Resultados Obtidos na Avaliação da Letalidade causada pelo (EB) e frações de *Bauhinia glabra* Jacq., Fabaceae sobre o Microcrustáceo *Artemia salina*.

A (TABELA 8) apresenta os resultados obtidos na avaliação da letalidade causada ao microcrustáceo *Artemia salina* frente ao (EB) e frações *B. glabra*. Pode-se observar pela análise da (TABELA 8) que a dose letal para todas as amostras foi superior a 1000µg/mL.

Esta concentração é considerada por Meyer *et al.* (1982) como o limite para se considerar uma amostra letal e acima deste valor as amostras são consideradas como não letais.

Cabe destacar, que este ensaio é citado como bom indicativo de correlação com atividade antitumoral, inseticida e anti-*Trypanosoma cruzi* para substâncias com $DL_{50\%} < 1000\mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982; McLAUGHLIN *et al.*, 1995; ALVES *et al.*, 2000).

TABELA 8 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE LETALIDADE FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina* REALIZADO PARA O (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

Amostra	DL _{50%} (µg/mL)
EB	> 1000
FH	> 1000
FC	> 1000
FA	> 1000
FM	> 1000
FR	> 1000

NOTA: OS DADOS FORAM EXPRESSOS COMO MEDIA±DESVIO PADRÃO DE 3 AMOSTRAS; AS MEDIAS FORAM COMPARADAS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA ($p<0,05$); AS AMOSTRAS FORAM CONSIDERADAS COMO APRESENTANDO POTENCIAL DE PROVOCAR LETALIDADE QUANDO ($DL_{50\%}<1000\mu\text{g/mL}$); ($DL_{50\%}$) DOSE LETAL PARA 50%, (EB) EXTRATO BRUTO, (FH) FRAÇÃO HEXANO, (FC) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (FA) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (FM) FRAÇÃO METANOL, (FR) FRAÇÃO REMANESCENTE.

5.2.3. Resultados Obtidos para as Análises do Potencial Hemolítico das Amostras (EB) e frações de *Bauhinia glabra* Jacq., Fabaceae

Conforme os resultados apresentados na (FIGURA 39) para o potencial hemolítico, pode-se perceber que todas as amostras se apresentaram ligeiramente hemolíticas. As medias foram agrupadas em 7 grupos, sendo todas diferentes entre si. As frações mais lipofílicas, (FH) e (FC), foram consideravelmente mais hemolíticas que as demais. Este fato pode ser justificado, uma vez que as membranas celulares são bicamadas lipídicas que podem ser dissolvidas por outros componentes lipídicos.

Outro fato que deve ser considerado é a presença de macromoléculas nas amostras avaliadas, como esteroides e taninos, que atuam diretamente na osmolaridade do sistema. Macromoléculas em contato com compartimentos celulares mantêm o meio extracelular hipertônico, rompendo as membranas.

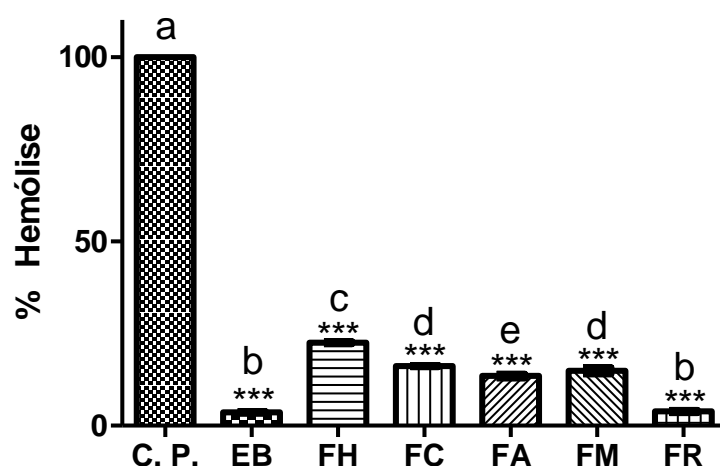


FIGURA 39: APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O POTENCIAL HEMOLÍTICO CAUSADO PELO (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: CADA COLUNA APRESENTA A MÉDIA±DESVIO PADRÃO DE 3 AMOSTRAS PARA O (EB) E FRAÇÕES DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE. OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS APRESENTAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$). (EB) EXTRATO BRUTO, (FH) FRAÇÃO HEXANO, (FC) FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, (FA) FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, (FM) FRAÇÃO METANOL, (FR) FRAÇÃO REMANESCENTE; (C.P.) CONTROLE POSITIVO.

5.3.RESULTADOS OBTIDOS PARA AS ANÁLISES DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *in vivo* PARA O (EB) DE *B. glabra* JACQ., FABACEAE

Nesta seção são apresentados os resultados encontrados na avaliação do potencial biológico *in vivo* realizada para o (EB) dos troncos de *B. glabra* com relação às propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias.

5.3.1. Resultados Obtidos na Avaliação das Propriedades Anti-Inflamatórias para o (EB) de *Bauhinia glabra* Jacq., Fabaceae pelo Método da Formalina

Dando-se início à avaliação das propriedades anti-inflamatórias do (EB) dos troncos de *B. glabra* são apresentados os resultados obtidos para o ensaio de nocicepção induzida pela formalina. Este modelo permite a avaliação de 2 momentos

distintos, a nocicepção de origem neurogênica fase I, e também a nocicepção de origem inflamatória de fase II (HUNSKAAR E HOLE, 1987, TJOLSEN *et al.*, 1992).

As doses avaliadas foram de 1mg/kg, 3mg/kg e 9mg/kg de animal. A (TABELA 9) apresenta os resultados obtidos para este ensaio.

TABELA 9 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO NÚMERO DE MOVIMENTOS BRUSCOS COM A PATA, POR TRATAMENTO, PARA O ENSAIO DA FORMALINA

Amostras	% \pm CV
Controle	100 \pm 12,48
1mg/kg	85,03 \pm 20,08
3mg/kg	59,77 \pm 24,22
9mg/kg	82,83 \pm 17,95

NOTA: OS DADOS FORAM EXPRESSOS COMO MEDIA \pm COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (n=8 ANIMAIS POR GRUPO; CONTROLE: ANIMAIS TRATADOS COM O VEÍCULO).

Conforme análise dos resultados apresentados na (TABELA 9) pode-se verificar que os tratamentos de 1mg/kg e 9mg/kg não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com o controle. Somente o tratamento de 3mg/kg apresentou diferenças mostrando uma diminuição de 40,34% dos movimentos bruscos com a pata desenvolvidos pelo animal.

Para uma melhor visualização os resultados são apresentados em gráfico, conforme (FIGURA 40) no qual pode-se perceber claramente uma diferença estatisticamente significativa somente no tratamento de 3mg/kg.

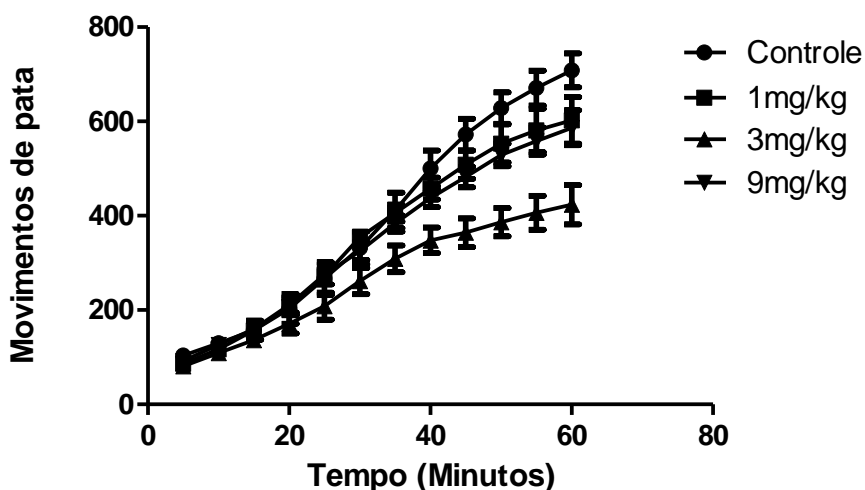


FIGURA 40: CURSO TEMPORAL OBTIDO PARA O ENSAIO DA FORMALINA FRENTE AO (EB) DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: OS RATOS FORAM TRATADOS COM O (EB) DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE (1mg/kg, 3mg/kg e 9mg/kg) OU VEÍCULO (TWEEN 80; 1%) E RECEBERAM INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE UMA SOLUÇÃO DE FORMALINA (FORMOL 2,5%) APÓS 30 MINUTOS. A FIGURA MOSTRA O CURSO TEMPORAL PARA O NÚMERO DE MOVIMENTOS BRUSCOS COM A PATA CUMULATIVAMENTE ATÉ 60 MINUTOS. AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA (GRUPOS DE 8 ANIMAIS). OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS MOSTRAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS SIGNIFICATIVAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$).

Através da análise da (FIGURA 40) percebe-se que somente após 40 minutos transcorridos do teste o tratamento de 3mg/kg distancia-se numericamente dos outros tratamentos. Os totais de movimentos bruscos com a pata foram contabilizados na totalidade, entre os períodos de 0-15 minutos (fase 1) e de 20-60 minutos (fase 2) e os resultados seguem.

A primeira fase que compreende o período entre 0-15 minutos está relacionada com nocicepção de origem neurogênica com alteração de limiar de dor por ação direta em nociceptores. Ao avaliar-se os resultados desta fase percebe-se que não houve diferença estatística significativa entre o controle e os tratamentos propostos.

Estes resultados sugerem que o (EB) de *B. glabra* não possui substâncias capazes de inibir diretamente os nociceptores no sistema nervoso central, levando-se em consideração que nenhuma concentração ensaiada apresentou atividade estatisticamente diferente daquela apresentada pelo controle.

Este mecanismo de ação central é descrito como sendo mais relacionado aos analgésicos do tipo opioides, como a morfina que tem como principal mecanismo a alteração do limiar de dor quando administradas (HUNSKAAR E HOLE, 1987).

A fase que compreende o tempo entre 20-60 minutos é descrita como relacionada com uma resposta inflamatória ao estímulo exógeno causado pela formalina. Nesta fase o tratamento de 3mg/kg do (EB) de *B. glabra* provocou uma diminuição estatisticamente significativa no número de movimentos bruscos com a pata que o animal desenvolveu.

Estes resultados que demonstram uma diminuição de aproximadamente 41% dos movimentos bruscos com a pata para o tratamento com 3mg/kg e sugerem que o (EB) dos troncos de *B. glabra* exerce efeito antinociceptivo por antagonismo a mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, interleucinas, entre outros.

Esta sugestão é ainda corroborada pela determinação de um alto teor de fitoesteroides e o isolamento de estigmasterol (1), β -sitosterol (2) e campesterol (3) a partir do (EB) dos troncos de *B. glabra* neste trabalho, que são citados como possuindo atividade anti-inflamatória por antagonismo destes mediadores.

O trabalho de Gabay *et al.* (2010) demonstrou que estigmasterol inibe muitos mediadores pró-inflamatórios. Estes trabalhos demonstram que este composto diminuiu significativamente a liberação de Prostaglandina E₂ em cultura celular de condrócitos de ratos, entre outros parâmetros como a expressão de receptores estimulada por IL-1 β .

Além disto o trabalho de Awad, Toczek e Fink (2004) demonstra que com a suplementação de fitoesteroides, células do tipo macrófagos incorporam estas moléculas aumentando em 26% o teor de esteroides de membrana, diminuindo assim o estresse oxidativo. Também demonstraram que com uma suplementação de 16 μ M de β -sitosterol (2) ou campesterol (3) houve uma diminuição significativa da liberação de PGE₂ e PGI₂ pelos macrófagos, quando comparados com o controle.

O trabalho de Santos *et al.* (1995) demonstrou que estigmasterol (1) e β -sitosterol (2) inibiram em uma curva dose-resposta as contrações abdominais induzidas pelo modelo do ácido acético intraperitoneal em ratos, com a dose efetiva para 50% dos animais (DE_{50%}) iguais a 16 e 9mg/kg, respectivamente.

Para o teste da formalina estes autores relataram que Estigmasterol (1) apresentou atividade em ambas as fases do teste, sendo a atividade em fase 2

substancialmente mais significativa com valores de (DE_{50%}) igual a 26mg/kg em administração intraperitoneal.

A ausência de resposta na fase 1 para o teste da formalina para o (EB) dos troncos de *B. glabra* contrariando o resultado proposto por Santos *et al.* (1995) pode ser explicada pelo fato de a concentração de Estigmasterol (1) presente no (EB) não ser suficiente para o desenvolvimento desta resposta. Por outro lado foi evidenciada uma resposta superior neste teste para a fase II provocada pelo (EB) de *B. glabra*, do que a encontrada por estes autores para a substância pura sugerindo um possível efeito sinérgico entre o estigmasterol (1) e os outros componentes do (EB).

Bhalke e Pal (2012) realizaram a avaliação da atividade anti-inflamatória de β -sitosterol (2) pelo método da formalina e evidenciaram resultados muito semelhantes àqueles encontrados por Santos *et al.* (1995) para Estigmasterol (1). Estes resultados uma vez mais corroboram as conclusões tomadas para o (EB) e sugerem que efeitos de sinergismo para esta amostra devem ser estudados. Estes autores descreveram uma diminuição de 60,84% da resposta ao ensaio da formalina em um tratamento de 20mg/kg administrada via intraperitoneal.

Os outros compostos identificados na espécie *B. glabra* também já foram avaliados com relação a promoção de resposta no teste da formalina. Segundo Chi *et al.* (2005) o ácido *p*-cumárico (9) não provoca resposta nas fases I e II do ensaio da formalina.

Com relação a cumarina simples (6), Piller *et al.* (1975) determinaram que esta molécula apresenta atividade antiedematogênica, quando o edema é induzido por estímulo térmico. Além disso há bastante tempo já se conhece o potencial anti-inflamatório que a cumarina simples (6) apresenta (VENUGOPALA, RASHMI E ODHAV, 2013).

Não há dados na literatura sobre a atividade anti-inflamatória dos *p*-cumaratos identificados neste trabalho.

Este perfil obtido, curva em “u”, para o teste da formalina pode significar que na dose de 9mg/kg o (EB) dos troncos de *B. glabra* começa a exercer efeito tóxico sobre os animais portanto considerou-se o resultado desta dose inconclusivo.

5.3.2. Resultados Obtidos na Avaliação do Comprometimento Motor Apresentado pelos Animais para o (EB) pelo Método do Campo Aberto

Para a validação dos resultados obtidos pelo experimento da avaliação da nocicepção induzida pela formalina, faz-se necessária a realização de experimentos que descartem a possibilidade de falso-positivo por comprometimento motor dos animais, causado pelos tratamentos. À luz desta premissa foi realizado o experimento do Campo Aberto que avalia o instinto de exploração que os animais apresentam quando submetidos a um ambiente diferente e novo.

Animais que não apresentam comprometimento motor provocado por substâncias que atuam em nível central, tem grande tendência a explorar novos ambientes enquanto aqueles comprometidos tem um comportamento apático e astênico, mantendo-se parados (ARCHER, 1973).

Além disto este teste pode ser realizado para a verificação de efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central. Animais com comportamento exploratório aumentado em comparação ao controle podem estar com suas funções motoras hiperestimuladas (MONTGOMERY, 1958).

Conforme os resultados apresentados na (FIGURA 41) não houve diferença estatística significativa entre as doses ensaiadas e o controle sugerindo que as substâncias químicas presentes no (EB) não apresentam potencial sedativo ou estimulante sobre o sistema nervoso central nas concentrações ensaiadas.

De fato não foram encontrados relatos na literatura sobre ações centrais relacionadas com as substâncias isoladas neste trabalho e que pudessem comprometer a capacidade motora dos animais.

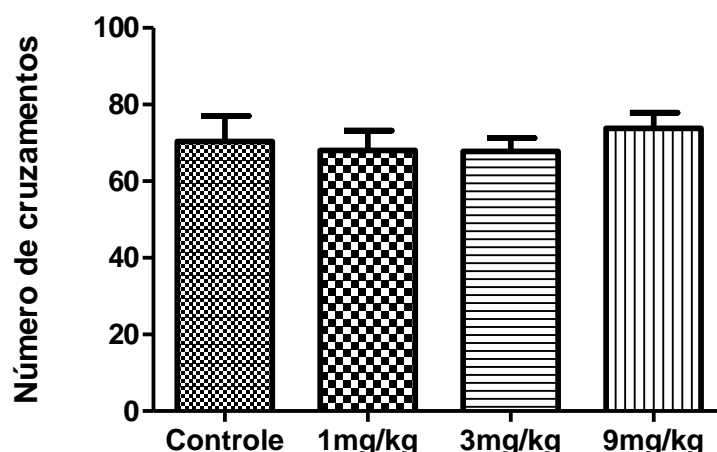


FIGURA 41: RESULTADOS OBTIDOS FRENTE O ENSAIO DO CAMPO ABERTO PARA O (EB) DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: OS RATOS FORAM TRATADOS COM O (EB) DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE (1mg/kg, 3mg/kg e 9mg/kg) OU VEÍCULO (TWEEN 80; 1%) E SUBMETIDOS A ESTE TESTE APÓS 30 MINUTOS. AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA (GRUPOS DE 5 ANIMAIS) DO NÚMERO DE CRUZAMENTOS DE CAMPO COM AS 4 PATAS. OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS MOSTRAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS SIGNIFICATIVAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$).

5.3.3. Resultados Obtidos na Avaliação da Atividade Antinociceptiva por Estímulo Térmico – Placa Quente

Após a retirada dos animais do Campo Aberto eles foram diretamente submetidos ao ensaio de nocicepção térmica pelo método da Placa Quente. Os ratos foram colocados sobre a placa e o tempo de permanência sobre ela foi cronometrado, levando-se em consideração o tempo máximo de corte estabelecido em 30 segundos de permanência. Os resultados para esta avaliação são apresentados na (FIGURA 42). Novamente, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos em comparação ao veículo.

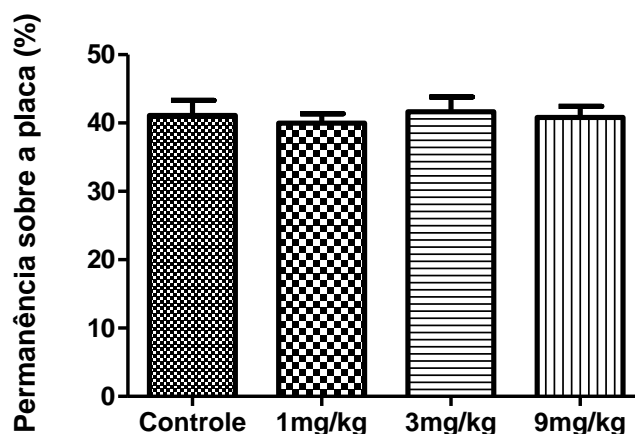


FIGURA 42: RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE NOCICEPÇÃO TÉRMICA PELO MÉTODO DA PLACA QUENTE PARA O EXTRATO BRUTO DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: OS RATOS FORAM TRATADOS COM O EXTRATO BRUTO DOS TRONCOS DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE (1mg/kg, 3mg/kg e 9mg/kg) OU VEÍCULO (TWEEN 80; 1%) E SUBMETIDOS A ESTE TESTE APÓS 30 MINUTOS. O TEMPO DE PERMANENCIA SOBRE A PLACA FOI EXPRESSO COMO A PORCENTAGEM RELATIVA AO TEMPO DE CORTE (30 SEGUNDOS). CADA COLUNA REPRESENTA A $MEDIA \pm ERRO$ PADRÃO DA MEDIA (GRUPO DE 5 ANIMAIS). OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS REPRESENTAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$).

Estes resultados sugerem uma vez mais a falta de atividade analgésica apresentada pelo (EB) dos troncos de *B. glabra* suportado pelos resultados obtidos no ensaio da formalina, bem como reforça os resultados observados no ensaio do campo aberto com relação ao não comprometimento motor dos animais.

5.3.4. Resultados Obtidos na Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória pela Medida do Edema de Pata Induzido por Carragenina

A atividade anti-inflamatória provocada pelo (EB) de *B. glabra* foi avaliada por sua capacidade de diminuir a formação de edema induzido por injeção intraplantar de carragenina. Os resultados para esta avaliação estão apresentados na (FIGURA 43).

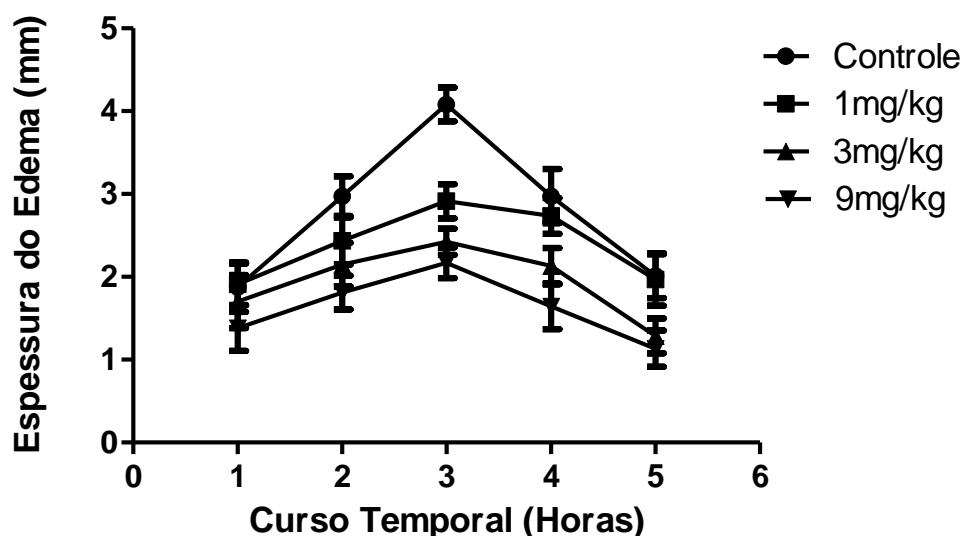


FIGURA 43: CURSO TEMPORAL OBTIDO PARA O ENSAIO DO EDEMA DE PATA PELO MÉTODO DA CARRAGENINA FRENTE AO (EB) DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE.

NOTA: OS RATOS FORAM TRATADOS COM O (EB) DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE (1mg/kg, 3mg/kg e 9mg/kg) OU VEÍCULO (TWEEN 80; 1%) E RECEBERAM INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE UMA SOLUÇÃO DE CARRAGENINA (300µg/100µL) APÓS 30 MINUTOS. A FIGURA MOSTRA O CURSO TEMPORAL PARA AS MEDIDAS DA ESPESSURA DA PATA (mm) A CADA HORA DURANTE 5 HORAS. AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA±ERRO PADRÃO DA MÉDIA (GRUPOS DE 8 ANIMAIS). OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS MOSTRAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS SIGNIFICATIVAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$).

Conforme pode ser observado na (FIGURA 43) os três tratamentos promoveram uma diminuição estatisticamente significativa na espessura do edema ao longo das 5 horas e os tratamentos foram considerados todos diferentes entre si conforme ($p < 0,05$). Para melhor visualização dos resultados, estes foram expressos como a área sobre a curva normalizada para 100% de espessura do edema para o controle negativo, confirmando o perfil dose-resposta, conforme (FIGURA 46).

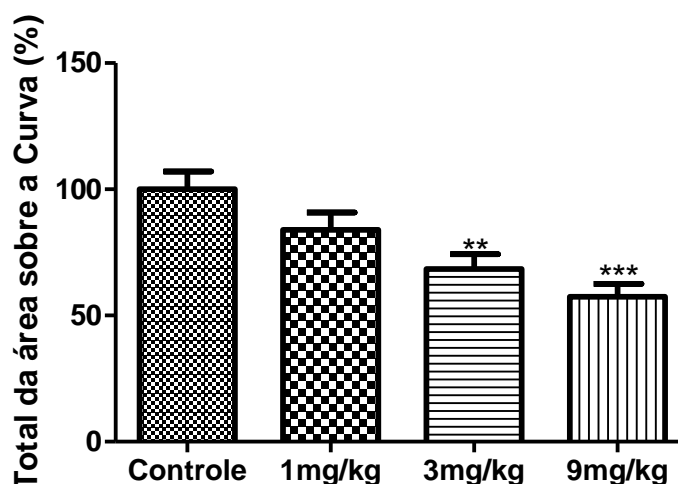


FIGURA 44: ÁREA SOB A CURVA NORMALIZADA PARA 100% DE EDEMA APRESENTADO PELO CONTROLE, PARA O ENSAIO DA CARRAGENINA DE (EB) DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE. NOTA: OS RATOS FORAM TRATADOS COM O (EB) DE *Bauhinia glabra* JACQ., FABACEAE (1mg/kg, 3mg/kg e 9mg/kg) OU VEÍCULO (TWEEN 80; 1%) E RECEBERAM INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE UMA SOLUÇÃO DE CARRAGENINA (300µg/100µL) APÓS 30 MINUTOS. AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA±ERRO PADRÃO DA MÉDIA (GRUPOS DE 8 ANIMAIS). OS DADOS FORAM AVALIADOS POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE UMA VIA. OS SÍMBOLOS ACIMA DAS BARRAS MOSTRAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS SIGNIFICATIVAS EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE ($p < 0,05$).

Segundo Nirmal *et al.* (2012), β -sitosterol (2) nas concentrações de 5, 10 e 20mg/kg (i. p.) apresentou atividade na redução do edema em aproximadamente 70% na segunda hora de ensaio. Este resultado é compatível com a atividade do controle positivo que estes pesquisadores utilizaram, ibuprofeno na concentração de 50mg/kg (i. p.), em uma curva dose-resposta.

Através de cálculos de área sob a curva até o tempo de 2 horas para a (FIGURA 44) tem-se que na concentração de 9mg/kg o (EB) reduziu 65,81% da formação do edema. Quando comparado este resultado com aquele encontrado por Nirmal *et al.* (2012) percebe-se que o (EB) de *B. glabra* possui uma potência aproximadamente 5 vezes maior que as amostras avaliadas por estes pesquisadores.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de extração se mostrou efetivo com rendimento em teor de sólidos para o (EB) de 92,85 g/kg de material vegetal seco e para cada fração, FH (21,39%), FC (20,06%), FA (5,68%), FM (40,23%) e FR (12,64%).

O (EB) apresentou os grupos de metabólitos glicosídeos antociânicos, saponinas, taninos condensados, derivados flavônicos, cumarinas e fitoesteróis.

O EB apresentou atividade em todos os métodos, como antioxidante, sendo as frações mais ativas FC e FM (DPPH), com IC₅₀% de 13,76µg/mL e 13,49µg/mL respectivamente, FH e FC (fosfomolibdênio), com IC₅₀% de 60,99µg/mL e 64,49µg/mL respectivamente, FH e FC (TBARS), com IPL% de 73,54% e 56,02% respectivamente e FH (recuperação do conteúdo de meta hemoglobina) com 2,96% de recuperação.

Com base nos resultados obtidos o ensaio do DPPH foi determinado como um importante parâmetro preliminar, pois sofre influência de todos os grupos de metabólitos.

O conteúdo total de fitoesteróis (TPhyC) parece influenciar significativamente os resultados do ensaio do TBARS e a recuperação do teor de meta hemoglobina;

O EB e frações não apresentaram letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e nem tampouco foram significativamente hemolíticas.

Oito substâncias foram isoladas por técnicas de cromatografia. Suas estruturas foram identificadas, por meio de técnicas espectroscópicas, como stigmasterol (1), β-sitosterol (2), campesterol (3), *p*-cumarato de nonadecil (4), *p*-cumarato de araquidil (5) e *p*-cumarato de heneicosil (6), e duas amostras ainda estão sendo identificadas.

Os compostos (4), (5) e (6) nunca foram isolados de uma espécie do gênero *Bauhinia* L. anteriormente. Além disto, há relatos do composto (5) como inibidor da enzima DNA isomerase.

O EB apresentou atividade sobre o modelo para a avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da formalina e o tratamento de 3mg/kg reduziu em 40,34% a resposta dos animais, somente na fase 2.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos testes do campo aberto e da placa quente entre os tratamentos e o controle negativo.

Os modelos da carragenina e do ácido acético intraperitoneal ainda estão sendo executados.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, T. M. D.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- APISANTIYAKOMA, S.; KITTA KOOP, P.; MANYUMA, T.; KIRTIKARAB, K.; BREMNER, J. B.; THEBTARANONTH, Y. Novel biologically active bibenzyls from *Bauhinia saccocalyx* Pierre. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, n. 11, p. 1694-1701, 2004.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behavior**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- AWAD, A. B.; TOCZEK, J.; FINK, C. S. Phytosterols decrease prostaglandin release in cultured P388D1/MAB macrophages. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n. 6, p. 511-520, 2004.
- BADARINATH, A. V.; MALLIKARJUNA, K. R.; MADHU, S. C. C.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T. V. S.; GNANAPRAKASH, K. A review on *in-vitro* antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276-1285, 2010.
- BALAJI, H.; PADMAJA, T. K.; BRAHMA NAIDU, P.; ROOPA NAIK, S.; BALAJI, M. Anti-inflammatory and antioxidant activity of ethanolic extract of *Bauhinia purpurea* bark. **International Journal of Drug Delivery**, v. 4, n. 4, p. 507-514, 2012.
- BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; DALL' STELLA, D. S. G.; MIGUEL, M. D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multififormis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 230-235, 2008.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. G. A.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

BARTNIKOWSKA, E. Biological activities of phytosterols with particular attention to their effects on lipid metabolism. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 59, n. 2, p. 105-112, 2009.

BATISTA, J. S.; ARRUDA, F. A. V.; AZEVEDO, A. R.; ALVES, A. A. Composição químico-bromatológica do feno de Cipó-de-Escada (*Bauhinia glabra* Jacq.) em cinco estádios de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 914-918, 1999.

BHALKE, R. D.; PAL, S. C. Antiinflammatory and antinociceptive activity of *Pterospermum acerifolium* leaves. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 2, p. 23-26, 2012.

BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOUIC, P. J. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 4, n. 6, p. 471-475, 2001.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIE, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BOURGAUD, F.; HEHN, A.; LARBAT, R.; DOERPER, S.; GONTIER, E.; KELLNER, S.; MATERN, U. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unrevealed for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 293-308, 2006.

BRASIL. Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. ANVISA. Resolução - RDC no 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos. Ministério da Saúde. Diário Oficial da União. Brasília-DF, 16 mar. 2004a.

BRASIL. ANVISA. Resolução - RE 89 de 16 de março de 2004. Determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil. Diário Oficial da União. Brasília - DF, 16 mar. 2004b.

BRASIL. ANVISA. Resolução - RE no 88 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília-DF, 16 mar. 2004c.

BRASIL. ANVISA. Resolução - RE no 90 de 16 de março de 2004. Determina o guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília-DF, 16 mar. 2004d.

BRASIL. ANVISA. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília-DF, 22 jun. 2006.

BRASIL. ANVISA. Instrução normativa no 5 de 11 de dezembro de 2008 - Determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil - Revoga o disposto da Resolução RE no 89 de 16 de março de 2004. Diário Oficial da União. Brasília - DF, 11 dez. 2008a.

BRASIL. ANVISA. Resolução - RDC nº 95, de 11 de dezembro de 2008 - Regulamenta o texto de Bula de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília – DF, 11 dez. 2008b.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHANG, S.; TAN, C.; FRANKEL, E. N.; BARRETT, D. M. Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, 147-151, 2000.

CHI, Y.; NAKAMURA, M.; YOSHIKAWA, T.; ZHAO, X.; YAN, W.; HASHIMOTO, F.; KINJO, J.; NOHARA, T.; SAKURADA, S. Anti-inflammatory activities of a-truxillic acid derivatives and their monomer components. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 9, p. 1776-1778, 2005.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Constituintes das cascas de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 36-38, 2003.

DAKSHA, A.; JAYWANT, P.; BHAGYASHREE, C.; SUBODH, P. Estimation of sterols content in edible oil and ghee samples. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 5, n. 1, p. 135-137, 2010.

DAS, S. N.; JAGANNATH, P. V.; DINDA, S. C. Evaluation of anti-inflammatory, anti-diabetic activity of indian *Bauhinia vahlii* (stembark). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1382-S1387, 2012.

DASSOLER, M.; SCHWANZ, M.; BUSSETO, F.; MOREIRA, E. A.; GUTIERREZ, L. Perfil fitoquímico e ensaio farmacológico de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 2, p. 4-8, 2004.

DELANEY, B.; STEVENS, L. A.; SCHMELZER, W.; HAWORTH, J.; McCURRY, S.; HILFINGER, J. M.; KIM, J. S.; TSUME, Y.; AMINDON, G. L.; KRITCHEVSKY, D. Oral absorption of phytosterols and emulsified phytosterols by sprague-dawley rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 5, p. 289-295, 2004.

DERE, S.; GUNES, T.; SIVACI, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll - A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. **Turkish Journal of Botany**, v. 22, p. 13-17, 1998.

DEWICK, P. M. 2002. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. New York: John Wiley & Sons.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 381-391, 2005.

FISCHER, D. C. H. Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos. In: Gil ES, Orlando RM, Matias R, Serrano SHP. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Campo Grande: Editora Uniderp, 2005.

FOLIN, O.; DENIS, W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. **Journal of Biological Chemistry**. v. 22, p. 305-308, 1915.

FURMAN, A. E. F.; HENNEBERG, R.; HERMANN, P. B.; LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A. J. Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates oxidative stress induction in erythrocytes of sickle cell disease patients. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 659-665, 2012.

GABAY, O.; SANCHEZY, C.; SALVATY, C.; CHEVY, F.; BRETON, M.; NOURISSATY, G.; WOLF, C.; JACQUES, C.; BERENBAUM, F. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. 106-116, 2010.

GANTAIT, A. M.; DAS, C.; PAL, T. K. Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of *Bauhinia acuminata* L. **International Journal of Natural Product Science**, v. 3, n. 5, p. 7-12, 2013.

GHOSH, A.; MISRA, S.; DUTTA, A. K.; CHOUDHURY, A. Pentacyclic triterpenoids and sterols from seven species of mangrove. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1725–1727, 1985.

GLADINE, C.; MORAND, C.; ROCK, E.; GRUFFAT, D.; BAUCHART, D.; DURAND, D. The antioxidative effect of plant extracts rich in polyphenols differs between liver and muscle tissues in rats fed n-3 PUFA rich diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 139, n. 3-4, p. 257-272, 2007.

GREBE, M.; MOBIUS, J. X. W. T.; UEDA, A.; NAKANO, H. J.; GEUZE, M. B.; ROOK, B.; SCHERES, B. Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. **Current Biology**, v. 13, n. 16, p. 1378-1387, 2003.

GRUNWALD, C., 1980. Steroids. In: Encyclopedia of Plant Physiology, Pirson, A. and Zimmermann, M. H. 8 221.

GUL, M. K.; AMAR, S. Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 5, p. 71-79, 2006.

GUTIÉRREZ, I. E. M.; NEPOMUCENO, C. F.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilanta*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 260-265, 2011.

HARBONE, J. B., 1998. Phytochemical methods: A guide to modern technique of plant analysis', Chapman and Hall, London.

HARBONE, J. B., BOULTER, D. TURNER, B.L., 1971. Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, New York, 612.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

JAIN, P. S.; BARI, S. B.; SURANA, S. J. Isolation of stigmasterol and γ -sitosterol from petroleum ether extract of woody stem of *Abelmoschus manihot*. **Asian Journal of Biological Science**, v. 2, n. 4, p. 112-117, 2009.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2005.

LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601-606, 1969.

LEWIS, G. P.; FORREST, F., 2005. Tribe Cercideae In: Lewis, G.; Schire, B.; Mackinder, B. & Lock, M. (eds.).

LOPE, E. R.; CHAPADEIRO, E.; RASO, P.; TAFURI, W. L. Bogliolo – Patologia. 4. ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan, p.67-112, 1987.

McLAUGHLIN, J. L.; SAIZARBITORI, T. C.; ANDERSON, J. E. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. **Revista de la Sociedad Venezolana de Química**, v. 18, p. 13-18, 1995.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C -NMR spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MARCONDES, O. F.; ALARCÓN-ENOS, J. *Bauhinia candicans* improves the endothelium-dependent relaxation in aortic rings of alloxan-diabetic rats. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 6, p. 485-490, 2010.

MARQUES, G. S.; ROLIM, L. A.; ALVES, L. D. S.; SILVA, C. C. A. R.; SOARES, L. A. L.; ROLIM-NETO, P. J. Estado da arte de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) como alternativa terapêutica para o tratamento do diabetes mellitus. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 313-320, 2013.

MENSOR, L. L.; MENEZER, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant

activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHELIN, D.; MORESCHI, P.; LIMA, A.; NASCIMENTO, G.; PAGANELLI, M.; CHAUD, M. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1958.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JUNIOR, E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S. Antioxidant activity of essential oils from northeastern Brazilian croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORÁN, L.; ANDRÉS, S.; BODAS, R.; BENAVIDES, J.; PRIETO, N.; PÉREZ, V.; GIRÁLDEZ, F. J. Antioxidants included in the diet of fattening lambs: Effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 3-4, p. 177-185, 2012.

MIZUSHINA, Y.; NISHIMURA, K.; TAKENAKA, Y.; TAKEUCHI, T.; SUGAWARA F.; YOSHIDA, H.; TANAHASHI, T. Inhibitory effects of docosyl p-coumarate on DNA topoisomerase activity and human cancer cell growth. **International Journal of Oncology**, v. 37, n. 4, p. 993-1000, 2010.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, 1979.

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrométrica de meta-hemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 1, p. 19-22, 2004.

NIRMAL, S. A.; PAL, S. C.; MANDAL, S. C.; PATIL, A. N. Analgesic and anti-inflammatory activity of β -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 219-224, 2012.

Nogueira, T. B. S. S.; Nogueira, R. B. S. S.; Silva, D. A.; Tavares, J. F.; Lima, E. O.; Pereira, F. O.; Fernandes, M. M. M. S.; Medeiros, F. A.; Sarquis, R. S. F. R.; Braz-Filho, R.; Maciel, J. K. S.; Souza, M. F. V. First chemical constituents from *Cordia exaltata* lam and antimicrobial activity of two neolignans. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11086-11099, 2013.

OLIVEIRA, L.; MUZITANO, M.; COUTINHO, M.; MELO, G.; COSTA, S. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil - Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Revista Científica Internacional**, v. 1, n. 17, p. 54-74, 2011.

PANDANABOINA, S. C.; KONDETI, S. R.; RAJBANSHI, S. L.; KUNALA, P. N.; PANDANABOINA, M. M.; WUDAYAGIRI, R. Alterations in antioxidant enzyme activities and oxidative damage in alcoholic rat tissues: Protective role of *Thespesia populnea*. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 150-159, 2012.

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D. G.; MIETTINEN, T. A.; TOIVO, J.; LAMPI, A. M. Review Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 939-966, 2000.

PILLER, N. B. A comparison of the effectiveness of some anti-inflammatory drugs on thermal oedema. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 56, n. 6, p. 554-559, 1975.

POZO-INSFRAN, D. D.; BRENES, C.H. & TALCOTT S. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Martius). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 6, p. 1539-1545, 2004.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

QUEIROZ, L. P. 2002. Distribuição das Leguminosae na Caatinga. pp: 141- 153. In: Sampaio, E.V.S.B.; Giuliatti, A.M.; Virgínio, J. & Gamarra- Rojas, C.F.L. (Eds). Vegetação & Flora da Caatinga. Recife, Associação de Plantas do Nordeste – APNE, Centro de Informações sobre Plantas – CNIP.

QUEIROZ, L. P. 2006a. The Brazilian Caatinga: Phytogeographical Patterns Inferred from Distribution Data of the Leguminosae. Pp: 113-149. In: Pennington, R.T.; Lewis, G.P. & Ratter, J.A. Neotropical Savanas and Seasonally Dry Forests. Plant Diversity, Biogeography and Conservation. London, CRC Press Taylor & Francis Group.

QUEIROZ, L. P. 2006b. Flowering plants of the Brazilian semi-arid. Pp.49-53. In: Queiroz, L. P.; Rapini, A. & Giulietti, A.M. Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity. Brasília, Ministério da Ciência e Tecnologia.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p.522-31, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBORDIEU, D., 2006. Handbook of enology (2nd ed.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

SALINAS, M. H. R., 1992. Famílias de dicotiledôneas vazezoelanas II. Subclases Rosidae y Asteridae: evolution, filogenia, gêneros. Mérida: [s.n.].

SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; PIZZOLLATI, M. G.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Medica**, v. 61, n. 4, p. 329-332, 1995.

SANTOS S.; SCHREIVER, L.; GRAÇA, J. Cuticular waxes from ivy leaves (*Hedera helix* L.): analysis of high-molecular-weight esters. **Phytochemical Analysis**, v. 18, n. 1, p. 60-69, 2007.

SILVA, R. R. Leguminosae no Pantanal de Barão de Melgaço, Mato Grosso, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 4, p. 353-357, 2011.

SILVA, K. L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do Gênero Bauhinia: Composição Química e Potencial Farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SIMÕES, C. M. O. *et al.*, 1998. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. 5.ed. Porto Alegre: UFGRS.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 649-662, 2004.

TJØLSEN A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. (eds). *The Pharmacology of pain*, Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. p. 1- 20, 1997.

TOMAZZONI, M.; NEGRELLE, R.; CENTA, M. 2006. Fitoterapia popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M. M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VAZ, A. M. S. F. New combinations in *Phanera* (Leguminosae; Cercideae) from Brazil. **Rodriguésia**, v. 61, p. S33-S40, 2010.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. 2013. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

WANG, T.; HICKS, K. B.; MOREAU, R. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 12, p. 1201-1206, 2002.

WEYDERT, C.J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 51-66, 2010.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

WILLAIN FILHO, A.; BREVIGLIERI, E.; CECHINEL FILHO, V.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive Effect of the Hydroalcoholic Extract of *Bauhinia splendens* Stems in Mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 8, p. 823-827, 1997.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WOOLFE, G.; MAC DONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307, 1944.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998. Determination of Haemolytic activity, IN: Quality control methods for medicinal plants material. Inglaterra 41.

WUNDERLIN, R. P.; LARSEN, K.; LARSEN, S. S. Cercideae. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), Advances in Legume Systematics. **Royal Botanical Gardens**, Kew, 107, 1981.

WUNDERLIN, R. P. Revision of the Arborescent *Bauhinias* (Fabaceae: Caesalpinioideae: Cercideae) Native to Middle America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 70, n. 1, p. 95-127, 1983.

YAMAMOTO, Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. **Journal of Dermatological Science**, v. 27, p. S1-S4, 2001.

YI, B.; HU, L.; MEI, W.; ZHOU, K.; WANG, H.; LUO, Y.; WEI, X.; DAI, H. (2010) Antioxidant phenolic compounds of cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10157-10167, 2010.

YOSHIDA, Y.; NIKKI, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. **Journal of Nutritional science and vitaminology**, v. 49, n. 4, p. 277-280, 2003.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 80-89, 2006.

ZAKARIA, Z. A.; ROFIEE, M. S.; TEH, L. K.; SALLEH, M. Z.; SULAIMAN, M. R.; SOMCHIT, M. N. *Bauhinia purpurea* leaves' extracts exhibited *in vitro* antiproliferative and antioxidant activities. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 65-74, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DO IBAMA/CGEN PARA A REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO	131
ANEXO 2 - PROTOCOLOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DOS GRUPOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	132
ANEXO 3 - AUTORIZAÇÃO DO comitê de ética em pesquisa PARA A REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO	137
ANEXO 4 – FOLHA DE ROSTO DO ARTIGO ACEITO DURANTE ESTE ESTUDO	138

ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DO IBAMA/CGEN PARA A REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº 35, DE 27 DE ABRIL DE 2011 Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "Estado Químico e Biológico das Espécies Vegetais".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, relatório anual sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Volney Zanardi Junior
Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.

ANEXO 2 - PROTOCOLOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DOS GRUPOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

a) Pesquisa de Alcaloides

A pesquisa qualitativa para alcaloides foi realizada utilizando-se os reativos gerais para alcaloides (RGA), a saber: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer); tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff); ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand).

Foi retirada uma amostra de 50mL do EB e evaporada em banho-maria a 50°C. O resíduo foi dissolvido em 1mL de etanol e a esta solução foram acrescentados 20mL de HCl 1%. Cinco tubos de ensaio foram preparados pela adição de 1mL da solução clorídrica preparada e ensaiadas com 2 gotas de cada reagente citado. Considerou-se positiva a presença de alcalóides na amostra com as seguintes visualizações para os reativos:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

b) Pesquisa de Leucoantocianidinas

Para a realização deste teste, 10mL do EB foi levado à secura, e então o resíduo foi dissolvido em 5mL de álcool etílico. Adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado, sob aquecimento até ebulição. A reação é considerada positiva quando há o desenvolvimento de uma coloração vermelha.

c) Pesquisa de Heterosídeo Flavônico

Preparou-se uma solução onde 20mL são levados à secura e dissolvidos em 10mL de etanol. Foram transferidos 5mL desta solução para cada tubo de ensaio, e em cada um foram adicionados 200mg de limalha de ferro e HCl concentrado

lentamente. O resultado positivo se observa com o desenvolvimento de coloração vermelha.

d) Pesquisa de Flavonóis

Foi realizada a pesquisa destes metabólitos pelo teste Oxálico-Bórico, onde 10mL do EB são secos em banho-maria, e então 5 gotas de acetona e 30mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1) são adicionadas, levando-se novamente a secura. A este resíduo foram então adicionados 5mL de éter etílico. A visualização foi realizada sob luz ultravioleta e fluorescência indica resultado positivo.

e) Pesquisa de Dihidroflavonois

Em uma cápsula de porcelana foram adicionados 10mL do EB, e este volume foi levado à secura. O resíduo foi aquecido em bico de bunsen com cristais de acetato de sódio, 0,1mL de anidrido acético e 0,1mL de HCl concentrado. O desenvolvimento de coloração roxa indica resultado positivo.

f) Pesquisa de Cumarinas

Para a pesquisa de cumarinas, 30 mL do EB foram concentradas até 5mL em banho-maria, a 50°C. O pH da solução foi ajustado para 1 por adição de HCl 2M, e a mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico (2x10mL).

Essas frações em acetato de etila foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5mL. Então transferiu-se 3mL para um tubo de ensaio, e adicionou-se 2mL de NaOH 2M, e algumas gotas da solução do tubo de ensaio foram avaliadas sob luz ultravioleta em 366nm. O teste é considerado positivo pela observação de fluorescência azul/verde amarelada.

g) Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos

Em balões de fundo chato foram transferidos 30mL do EB e 5mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura foi levada ao refluxo por uma hora, e posteriormente filtrada, seguida de adição de 30mL de H₂O.

A solução anterior foi submetida à extração com éter etílico (2x10mL) e as frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de 5mL. Após este procedimento, a amostra foi transferida para tubo de ensaio, e a este foram adicionados 5mL de NH₄OH (Reação de Borntraeger). A reação é considerada positiva com observação do desenvolvimento de coloração vermelha.

h) Pesquisa de Esteroides e Triterpenos

O EB (10mL) foi evaporada à secura e o resíduo redissolvido em 5mL de clorofórmio e filtrado em algodão. Da amostra, 0,1; 0,5 e 1,0mL foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2mL com clorofórmio.

- Reação de Liberman-Bouchard: Para essa reação, foram adicionados aos tubos de ensaio 1mL de anidrido acético e lentamente 2mL de H₂SO₄ concentrado.

A coloração indica:

- Rósea ou azul: Presença de grupo funcional carbonila na posição 3 e dupla ligação nas posições 5 e 6 ou 7 e 8.

- Verde: Grupo funcional hidroxila na posição 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8.

- Amarela: Grupamento metila no carbono 14.

- Reação de Keller Kelliani

Levou-se à secura 2mL dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2mL de ácido acético glacial e 0,2mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Transferiu-se então as misturas para tubos de ensaio

contendo 2mL de H_2SO_4 . O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:

- Azul: Esteroides;
- Verde: Triterpenos.

i) Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos

Foram separados 5mL do EB em 3 tubos de ensaio. No primeiro tubo de ensaio adicionou-se HCl 1% até pH 4. A observação de tons avermelhados indica reação positiva. A solução contida no segundo tubo de ensaio foi alcalinizada com NaOH até pH 10, e em caso positivo, observou-se tons azulados.

A solução do terceiro tubo de ensaio foi neutralizada a pH 7, e para resultado positivo observou-se o aparecimento de tons violáceos. Após este procedimento, 10mL do extrato foram particionados com álcool butílico em funil de separação por duas vezes, onde as frações foram reunidas em cápsula de porcelana e concentradas até 5mL.

A estas soluções foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e aquecida até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antocianidinas.

j) Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos

Para esse teste utilizaram-se 3 tubos de ensaio com 1mL do EB. Estes tubos de ensaio foram agitados energeticamente por cinco minutos, e a altura (em centímetros) da espuma formada foi medida. Após repouso de 30 minutos, a presença de saponinas foi confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1cm.

k) Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos

A um tubo de ensaio foram adicionados 5mL do EB, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1ml de H_2SO_4 10%. Suspendeu-se uma tira de papel picro-

sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo-o em banho-maria (60°C) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos foi observado pelo desenvolvimento de coloração marrom à vermelho no papel picro-sódico.

I) Pesquisa de Taninos

Transferiu-se 1mL do EB para cinco tubos de ensaio e adicionou-se a cada um os seguintes reagentes:

Tubo 1: 3 gotas de cloreto férrico. Coloração azul ou verde, com formação ou não de precipitado – resultado positivo para taninos.

Tubo 2: 3 gotas de sulfato amoniacal. Coloração azul ou verde – resultado positivo.

Tubo 3: 3 gotas de cloridrato de emetina. Formação de precipitado – resultado positivo.

Tubo 4: 5mL de ácido acético (gota a gota) e 5mL de acetato de chumbo. Presença de precipitado – resultado positivo.

Tubo 5: 3 gotas de dicromato de potássio 1%. Desenvolvimento de precipitado – resultado positivo.

Para a diferenciação entre taninos condensados e hidrolisáveis foram transferidos 30mL do extrato para um balão de fundo chato com a adição de 6mL de formaldeído 40% e 4mL de ácido clorídrico concentrado. Essa mistura foi aquecida em refluxo por uma hora, resfriada e filtrada.

O resíduo do papel de filtro foi lavado com solução de álcool a 50% e então adicionadas algumas gotas de KOH a 5%. A coloração verde indicou a presença de taninos condensados. Ao filtrado adicionou-se excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%, e a coloração azul indicou a presença de taninos hidrolisáveis.

ANEXO 3 - AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA A REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 762

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o conteúdo no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.052145/2013-95

APROVADO: 13/02/2014 – R.O. 01/2014

TÍTULO: Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato bruto dos troncos de *Beuhnia glabra*

AUTORES: Joice Maria da Cunha, Ranieri Campos, Beatriz Cristina K. Hirota, Cristiane da Silva Paula

DEPARTAMENTO: Farmacologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA

ANEXO 4 – FOLHA DE ROSTO DO ARTIGO ACEITO DURANTE ESTE ESTUDO

MULTIVARIATE ANALYSIS BETWEEN THE PHYTOCHEMICAL FEATURES AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE STEMS OF *Bauhinia glabra* JACQ. (FABACEAE)

Ranieri Campos*, Vinícius Bednarczuk de Oliveira, Cristiane da Silva Paula, Roberto Pontarolo, Josiane de Fátima Gaspari Dias, Marilis Dallarmi Miguel, Sandra Maria Warumby Zanin, Obdulio Gomes Miguel*

Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de farmácia, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba, PR, Brazil.

Corresponding author. Tel.: +55-41-3360-4070.

E-mail address: raniericampos@uol.com.br (R. Campos).